

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-521489

(P2002-521489A)

(43)公表日 平成14年7月16日(2002.7.16)

(51)Int.Cl.  
A 6 1 K 31/711  
A 6 1 P 11/06  
17/00  
27/02  
29/00

識別記号

F I  
A 6 1 K 31/711  
A 6 1 P 11/06  
17/00  
27/02  
29/00

テマコード\*(参考)  
4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-562385(P2000-562385)  
(86) (22)出願日 平成11年7月27日(1999.7.27)  
(85)翻訳文提出日 平成13年1月25日(2001.1.25)  
(86)国際出願番号 PCT/US99/17100  
(87)国際公開番号 WO00/06588  
(87)国際公開日 平成12年2月10日(2000.2.10)  
(31)優先権主張番号 60/094,370  
(32)優先日 平成10年7月27日(1998.7.27)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーション  
アメリカ合衆国 アイオワ 52242-5000,  
アイオワ シティ, テクノロジー イノベイション センター 214  
(72)発明者 クリーブ, アーサー エム.  
アメリカ合衆国 アイオワ 52246, アイオワ シティー, パーク ブレイス 890  
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CpGオリゴヌクレオチドの立体異性体および関連する方法

(57)【要約】

核酸とタンパク質との相互作用は、R立体異性体について選択的、S立体異性体について選択的であり得るか、または立体非依存性であり得る。本発明は、CpG含有DNAのS立体異性体が、CpG-DNAの免疫刺激効果を媒介することにおいて活性であることを実証する。本発明は、CpG-DNAについての臨床適用(例えば、ワクチンアジュvant、レトロウイルス疾患、ウイルス疾患、寄生生物疾患または真菌疾患の予防もしくは処置のための免疫活性化因子、あるいは癌免疫治療、アレルギー疾患および喘息疾患の免疫治療など)のための、純粋な立体異性体の、すなわちこの形態について富化されたDNAの使用方法を提供する。本発明はまた、CpG-DNAの免疫刺激効果に対応する、R立体異性体DNAについての使用法を提供する。このようなR立体異性体は、敗血症症候群、腸炎症疾患、乾癬、歯肉炎、全身性エリテマトーデスおよび他の自己免疫疾患のような疾患の処置において有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで、複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有し、ここで、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub>は、TpA、ApA、ApC、およびGpGからなる群から選択されるヌクレオチドであり、そしてここで、X<sub>3</sub> X<sub>4</sub>は、TpT、TpA、TpG、ApA、ApG、GpA、およびCpAからなる群から選択されるヌクレオチドである、を含む組成物。

【請求項2】 組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



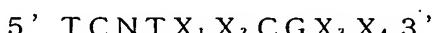
ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドが、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで、複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有し、ここで、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub>は、TpT、TpG、ApT、GpC、CpC、CpT、TpC、GpTまたはCpGであり；X<sub>3</sub>は、AまたはTであり、そしてX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであるが、ここで、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub>が、TpC、GpT、TpG、TpT、またはCpGである場合、X<sub>3</sub> X<sub>4</sub>はTpC、ApT、ApG、TpG、またはApCではない、を含む組成物。

【請求項3】 少なくとも75%の前記キラル中心がSキラリティーを有する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】 少なくとも90%の前記キラル中心がSキラリティーを有する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項5】 組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Nは、約0～25ヌクレオチドからなる核酸配列であり、ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチド

であり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

【請求項6】 組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物であり、そしてここで該組成物は、少なくとも2つの異なる配列を有する免疫刺激核酸を含む、組成物。

【請求項7】 さらに抗原を含む、請求項1、2、5または6のいずれかに記載の組成物。

【請求項8】 さらに抗ウイルス剤を含む、請求項1、2、5または6のいずれかに記載の組成物。

【請求項9】 さらに非核酸アジュバントを含む、請求項1、2、5または6のいずれかに記載の組成物。

【請求項10】 組成物であって、以下：

一方の鎖上に、少なくとも以下の式を含む配列を有する、二重鎖免疫刺激核酸



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物であり、そして核酸送達複合体をさらに含む組成物。

【請求項11】 被験体の免疫応答をT h 2からT h 1へ再指向させるための組成物であって、以下：

被験体の免疫応答をT h 2からT h 1へ再指向するために有効な量で、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項12】** 被験体において喘息を処置するための組成物であって、以下：

被験体において喘息を処置するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項13】** アレルゲンとの接触に応答したアレルギー反応の発生に対して被験体を除感作するための組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項14】** 樹状細胞を活性化するための組成物であって、以下：

樹状細胞を活性化するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリ

ティーを有する、を含む組成物。

【請求項15】 癌を処置するための組成物であって、以下：

癌を処置するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

【請求項16】 前記組成物が、癌治療に対する癌細胞の応答性を増大させるための組成物であり、抗癌治療と組み合わせて投与される前記免疫刺激核酸を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】 前記抗癌治療が抗体である、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】 癌治療被験体において骨髄の回復を増強するための組成物であって、以下：

骨髄の回復を増強するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

【請求項19】 、癌を有する被験体において、抗原依存性細胞性細胞傷害(ADCC)に関与するタイプの免疫応答を刺激するための組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を

形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項20】** 被験体においてサイトカイン産生を誘導するための組成物であって、以下：

被験体においてサイトカイン産生を誘導するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項21】** ナチュラルキラー細胞溶解活性を刺激するための組成物であって、以下：

ナチュラルキラー細胞溶解活性を刺激するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項22】** 被験体においてTh-1型免疫応答を誘導するための組成物であって、以下：

Th-1型免疫応答を誘導するために有効な量の、アジュバントの組み合わせを含む、組成物であり、ここで、該アジュバントの組み合わせは、少なくとも以下の式を含む配列を有する少なくとも1つの免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリ

ティーを有する、免疫刺激核酸、ならびに少なくとも1つの非核酸アジュバントを含む、組成物。

**【請求項23】** 粘膜の免疫応答を誘導するための組成物であって、以下：  
粘膜の免疫応答を誘導するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項24】** 組成物であって、以下：  
少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで、複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有し、ここで、 $\text{X}_1 \text{ X}_2$ は、TpA、ApA、ApC、およびGpGからなる群から選択されるヌクレオチドであり、そしてここで、 $\text{X}_3 \text{ X}_4$ は、TpT、TpA、TpG、ApA、ApG、GpA、およびCpAからなる群から選択されるヌクレオチドである、を含む組成物。

**【請求項25】** 組成物であって、以下：  
少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで少なくとも2つのヌクレオチドが、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで、複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有し、ここで、 $\text{X}_1 \text{ X}_2$ は、TpT、TpG、ApT、GpC、CpC、CpT、TpC、GpTまたはCpGであり； $\text{X}_3$ は、AまたはTであり、そして $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであるが、ここで、 $\text{X}_1 \text{ X}_2$ が、TpC、GpT、TpG、TpT、またはCpGである場合、 $\text{X}_3 \text{ X}_4$ はTpC、ApT、ApG、TpG、またはApCではない、を含む組成物。

**【請求項26】** 組成物であって、以下：

一方の鎖上に、少なくとも以下の式を含む配列を有する二重鎖免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有する、を含む組成物であり、そして核酸送達複合体をさらに含む、組成物。

**【請求項27】** 過剰な免疫応答を有する被験体において免疫応答を防ぐための組成物であって、以下：

免疫応答を防ぐために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項28】** 炎症性疾患を有するまたはを有する危険性のある被験体を処置するための組成物であって、以下：

免疫応答誘導を防ぐために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{X}_3$ および $\text{X}_4$ は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有する、を含む組成物。

**【請求項29】** 組成物であって、以下：

少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、ここで、複数の該キラル中心は、Sキラリティーを有し、そしてここで、X<sub>1</sub>はヌクレオチドである、を含む組成物。

【請求項30】 感染チャレンジに対する抗原非特異的先天性免疫の活性化および広域スペクトル耐性を誘導するための組成物であって、以下：

感染チャレンジに対する抗原非特異的先天性免疫の活性化および広域スペクトル耐性を誘導するために有効な量の、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸：



ここで、Cは、メチル化されておらず、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、ここで、少なくとも2つのヌクレオチドは、キラル中心を形成するリン酸骨格修飾を有し、そしてここで複数の該キラル中心は、Rキラリティーを有する、を含む組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的に、CpGオリゴヌクレオチドの立体異性体、および詳細にはSアイソフォームに関する。本発明はまた、CpGオリゴヌクレオチドの立体異性体の使用方法に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

遺伝コードを運ぶその役割は別として、DNAは、最近、シグナル伝達分子としての機能を示すことが示された (Krieg, A. M. 1998, Biologs)。高等真核生物の免疫系は、特定の塩基の状況において、非メチル化CpGジヌクレオチドのそれらの状況に基づいて、原核生物の核酸を検出するための機構を進化させてきたと考えられる (Krieg, A. K. ら、1995, Nature, 374: 546)。非メチル化CpGジヌクレオチドは、細菌DNAにおいて通常であるが、脊椎動物DNAにおいて、不十分であり (「CpG抑制」) そしてメチル化されている (Bird, A. P. 、1987, Trends in Genetics, 3: 342)。免疫刺激性塩基の状況において、これらの非メチル化CpGジヌクレオチドを含むDNA (「CpGモチーフ」) は、B細胞活性化、活性化誘導アポトーシスに対する耐性ならびにIL-6およびIgMの分泌を誘導することにより体液性免疫を誘引する (Krieg, A. K. ら、1995, Nature, 374: 546; Yi, A. K. ら、1996, J. Immunol. , 157: 5394; およびKlinman, D. ら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2879)。このようなCpG DNAはまた直接単球およびマクロファージを活性化し、Th1-様サイトカインを分泌する (Ballas, Z. K. ら、1996, J. Immunol. , 157: 1840; Cowdery, J. S. ら、1996, J. Immunol. , 156: 4570; およびHalpern, M. D. ら、1996, Cell. Immunol. , 167: 72)。これは、ナチュラルキラー (NK) 細胞溶解活性およびインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )

) 分泌の活性化を誘導する (Ballal, Z. K. ら、1996, J. Immunol. 157: 1840; Cowdery, J. S. ら、1996, J. Immunol. 156: 4570; およびChace, J. H. 、1997, Clin. Immunol. Immunopath. 84: 185)。免疫活性化に対するCpGオリゴヌクレオチドの効果は、1997年10月30日に出願された米国特許出願番号08/960, 774 (これは、1996年10月30日に出願された米国特許出願番号08/738, 652の一部継続出願、1995年2月7日に出願された米国特許出願番号08/386, 063の一部継続出願、および1994年7月15日に出願された米国特許出願番号08/276, 358の一部継続出願である (それぞれの全体が、本明細書中に参考として援用される) ) の、共通に割り当てられ、そして共通の特許性を有する米国特許出願に記載される。

#### 【0003】

ネイティブのDNAは、ホスホジエステル骨格を有し、そして生存細胞中で、多くのエキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼにより急速に分解される。しかし、ヌクレアーゼ耐性ホスホチオエート骨格を有するCpGオリゴヌクレオチドは、著しく増強された免疫刺激効果を有する (Krieg, A. M. ら、1996, Antisense Res. Dev. 6: 133 およびZhao, Q. ら、1996, Biochem. Pharmacol. 51: 173)。正常なホスホジエステルDNAの骨格は、キラル中心を有さないが、ホスホチオエート改変は、硫黄原子とホスホジエステル結合上の2つの非架橋酸素の1つを置換し、新しいキラル中心を作製する。各ホスホチオエートDNA骨格におけるヌクレオチド間結合は、R立体異性体またはS立体異性体のいずれかであり得る。

#### 【0004】

ネイティブDNAが、アキラルであるため、DNAと相互作用するタンパク質が、立体選択的様式または立体依存的様式で相互作用するかどうかは、公知ではない。いくつかの研究が、この問題を研究するために、キラルに純粋なホスホチオエートオリゴヌクレオチドを用いて、実施されている。DNAとのいくらか

の相互作用が、R立体異性体に特異的であることが見出された。例えば、ヘビ毒液ホスホジエステラーゼまたは3'エキソヌクレアーゼによるDNAの分解は、R立体異性体に特異的であり、そしてS立体異性体で極度に非能率的である (Bergers, P. M. およびF. Eckstein, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4798; Bergers, P. M. ら, 1979, Eur. J. Biochem., 100: 585; Tang, J. A. ら, 1995, Nucleosides and Nucleotides, 14: 985; Koziołkiewicz, M. ら, 1997, Antisense and Nucleic Acid Drug Devel., 7: 43; およびGilar, M. A. ら, 1998, Antisense and Nucleic Acid Drug Devel. 8: 35)。同様に、RNA/DNA二重鎖のRNase H切断は、DNA成分のR立体異性体に選択的である (Koziołkiewicz, M. ら, 1995, Nucleic Acids Res., 23: 5000)。相補的RNAへのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、SについてよりもR立体異性体についてより高いことが報告されており (Tang, J. ら, 1995, Nucleosides and Nucleotides, 14: 985; およびKoziołkiewicz, M. ら, 1995, Nucleic Acids Res., 23: 5000)、いくつかの実験系においてオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性を有する (Fearon, K. L. ら, 1997, Oligonucleotides as Therapeutic Agents, Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 209) New York, 19頁)。

#### 【0005】

一方、いくつかの実験系は、S立体異性体のみを認識する。例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼは、S立体異性体に優先的に結合する (Bergers, P. M. およびF. Eckstein, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4798)。ヌクレアーゼP1およびEcoRIエンドヌクレアーゼは両方に優先的に結合し、そしてS立体異性体を切断する (

Griffith, S. A. D. 、 1987、 Nucleic Acids Res. 、 15 : 4145 ; Lesser, D. R. ら、 1992、 J. Biol. Chem. 、 267 : 24810 ; および Kurpiewski, M. R. ら、 1996、 Biochem. 、 35 : 8846)。注目すべきは、 T7RNA ポリメラーゼはまた S 塩基を使用し、そして R を使用できない (この酵素により產生される RNA が、 R 立体異性体であるという事実にもかかわらず) (Griffith, A. D. ら、 1987、 Nucleic Acids Res. 、 15 : 4145)。DNA の特定の 4 つの鎖構造は、 S 立体異性体とより安定であるようであり (Kanehara, H. ら、 1997、 Biochem. 、 36 : 1790) そしていくつかの S 立体異性体はまた、特定の実験系において、細胞およびインビオにおいてより大きなアンチセンス活性を有することが報告されている (Steck, W. J. 、 1997、 Antisense and Nucleic Acid Drug Devel. 、 7 : 567)。

#### 【0006】

これらの立体選択性生物学的活性と対照的に、クレアチンキナーゼとの核酸の相互作用は、カチオンの存在に依存して、 R または S 立体異性体のいずれかについて選択的であり得る (Bergers, P. M. および F. Eckstein 、 1980)。一方、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの、塩基性線維芽細胞成長因子、 CD4 、ラミニンおよびフィブロネクチンへの結合は、立体選択的ではない (Benimetskaya, L. ら、 1995、 Nucleic Acids Res. 、 23 : 4239)。従って、タンパク質との核酸の相互作用は、 R 立体異性体、 S 立体異性体について選択的であり得るか、または立体非依存性であり得る。

#### 【0007】

##### (発明の要旨)

本発明は、 CpG オリゴヌクレオチドの立体異性体および使用法に関する。本発明は、オリゴヌクレオチドを含むリン酸骨格改変 CpG の S 立体異性体のみが免疫応答を媒介する際に活性化されるという発見に一部基づく。 CpG 含有核酸の立体的に無作為な (stereorandom) R 立体異性体およびキラルに

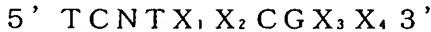
純粋なR立体異性体の両方が同一の配列のキラルに純粋なS立体異性体と比較して減少した免疫刺激特性を有することが発見された。S立体異性体で刺激されている細胞へのR立体異性体の添加は、免疫刺激効果において用量依存性の減少を生じた。従って、本発明の方法により、SおよびR立体異性体の混合物またはR立体異性体単独を含むCpG組成物を投与するよりも、S立体異性体のキラルに純粋な形態であるCpG組成物のより低い用量を投与することが可能である。これらの知見は、免疫刺激CpG含有核酸の臨床的な開発に重要な意味を有する。

#### 【0008】

1つの局面において、本発明は、少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫刺激核酸の組成物である：



ここで、CおよびGは、メチル化されておらず、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成するリン酸骨格改変を有し、そして複数のキラル中心は、Sキラルを有する。いくつかの実施態様において、免疫刺激核酸は、少なくとも以下の式を含む配列を有する：



ここで、Nは、約0～25ヌクレオチドからなる核酸配列である。

#### 【0009】

いくつかの実施態様において、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>は以下からなる群から選択されるヌクレオチドである：TpA、ApA、ApC、ApGおよびGpG。他の実施態様において、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>は以下からなる群から選択されるヌクレオチドである：TpT、TpA、TpG、ApA、ApG、GpAおよびCpA。さらに他の実施態様において、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>は以下からなる群から選択されるヌクレオチドであり：TpT、TpG、ApT、GpC、CpC、CpT、TpC、GpTおよびCpG；X<sub>3</sub>は、AおよびTからなる群から選択されるヌクレオチドであり、そしてX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであるが、ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>がTpC、GpTまたはCpGである場合、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>はTpC、ApTまたはApCではない。

#### 【0010】

いくつかの局面または実施態様において、免疫刺激核酸は、二本鎖であり、そ

して他においては1本鎖である。

#### 【0011】

いくつかの実施態様において、組成物は、骨格改変を有する全てよりは少ないヌクレオチドを有する。他の実施態様において、全てよりは少ないキラル中心が、Sキラルを有する。好ましい実施態様において、ヌクレオチドの少なくとも50%、75%または90%が、骨格改変を有する。他の好ましい実施態様において、キラル中心の少なくとも60%、75%または90%が、Sキラリティーを有する。

#### 【0012】

組成物は、いくつかの実施態様において、同一の配列を有する免疫刺激核酸を含む。他の実施態様において、組成物は、少なくとも2つの異なる配列を有する免疫刺激核酸を含む。

#### 【0013】

この組成物はまた、他の化合物（例えば、抗原、サイトカイン（例えば、GM-CSF、IL-4、IL-18、IFN $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、Flt3リガンド、およびIL-3）、抗ウイルス、抗細菌、または非核酸アジュvant）を含み得る。

#### 【0014】

他の局面において、本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチドを使用する方法を包含する。これらの方法には、以下が挙げられる：被験体において抗原特異的免疫応答を誘導する方法、Th2からTh1へ被験体の免疫応答を再指向する方法、被験体においてぜん息を処置する方法、アレルゲンとの接触に対する応答において、アレルギー反応の発生に対して被験体を脱感作する方法、免疫細胞を活性化する方法、癌を処置する方法、癌治療を受けた被験体において骨髄の回復を強する方法、癌を有する被験体において免疫応答を刺激する方法、この型の方法は抗原依存細胞性細胞傷害（ADCC）に関与し、改良としては、被験体においてサイトカイン産生を誘導する方法、ナチュラルキラー細胞溶解活性を刺激する方法、被験体においてTh1型免疫応答を誘導する方法、および粘膜免疫応答を誘導する方法。

## 【0015】

別の実施態様において、核酸配列は少なくとも式G T C G T X<sub>4</sub>を含む配列を有する。

## 【0016】

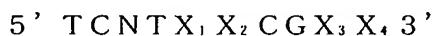
別の局面において、本発明は、C p G含有核酸のR立体異性体が免疫応答を誘導するS立体異性体の能力を減少するという知見に基づく。そうすることが所望される場合、部分的にまたは完全にR立体異性体から構成されるC p G核酸を使用して、免疫応答を阻害し得る。例えば、C p G核酸が、非常に高用量で投与され、そして所望するよりも大きな免疫応答を引き起こす場合、R立体異性体は、C p Gの免疫刺激効果をアンタゴナイズするために投与され得る。あるいは、一過性の免疫刺激効果のみが所望される場合、R立体異性体は免疫応答を減少するために投与され得る。従って、R立体異性体を適切な時期に投与することにより、C p G誘導免疫応答の時期を調節することが可能である。C p GのR立体異性体はまた、過剰な免疫応答により媒介される障害の治療的処置に有用である。従って、R立体異性体を治療剤として使用して、炎症性障害を処置し得る。

## 【0017】

別の局面において、本発明は少なくとも以下の式を含む配列を有する免疫阻害核酸の組成物である：



ここで、CおよびGは、メチル化されておらず、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドであり、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成するリン酸骨格改変を有し、そして複数のキラル中心は、Rキラリティーを有する。いくつかの実施態様において、免疫阻害核酸は、少なくとも以下の式を含む配列を有する：



ここで、Nは、約0～25ヌクレオチドからなる核酸配列である。

## 【0018】

いくつかの実施態様において、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub>は以下からなる群から選択されるヌクレオチドである：T p A、A p A、A p C、A p GおよびG p G。他の実施態様に

において、 $X_3 X_4$  は以下からなる群から選択されるヌクレオチドである： T p T、 T p A、 T p G、 A p A、 A p G、 G p A および C p A。さらに他の実施態様において、 $X_1 X_2$  は以下からなる群から選択されるヌクレオチドであり： T p T、 T p G、 A p T、 G p C、 C p C、 C p T、 T p C、 G p T および C p G；  $X_3$  は、 A および T からなる群から選択されるヌクレオチドであり、そして  $X_4$  は、 ヌクレオチドであるが、ここで、 $X_1 X_2$  が T p C、 G p T または C p G である場合、 $X_3 X_4$  は T p C、 A p T または A p C ではない。

#### 【0019】

いくつかの局面または実施態様において、免疫阻害核酸は、二本鎖であり、そして他においては1本鎖である。

#### 【0020】

いくつかの実施態様において、組成物は、骨格改変を有する全てよりは少ないヌクレオチドを有する。他の実施態様において、全てよりは少ないキラル中心が、R キラリティーを有する。好ましい実施態様において、ヌクレオチドの少なくとも 50%、75% または 90% が、骨格改変を有する。他の好ましい実施態様において、キラル中心の少なくとも 60%、75% または 90% が、R キラリティーを有する。

#### 【0021】

組成物は、いくつかの実施態様において、同一の配列を有する免疫阻害核酸を含む。他の実施態様において、組成物は、少なくとも 2 つの異なる配列を有する免疫阻害核酸を含む。

#### 【0022】

この組成物はまた、他の化合物（例えば、抗原、サイトカイン（例えば、GM-CSF、IL-4、IL-18、IFN $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、Flt3リガンド、および IL-3）、抗ウイルス、抗細菌、または非核酸アジュバント）を含み得る。

#### 【0023】

本発明はまた、本発明の免疫阻害オリゴヌクレオチドを用いて、被験体において免疫応答を阻害し、そして炎症性疾患を処置する方法を包含する。

**【0024】**

さらに別の局面によると、本発明は、抗原非特異的先天免疫活性化および感染性チャレンジに対する広域スペクトルの耐性を誘導する方法である。

**【0025】**

本発明の各々の限定は、本発明の種々の実施態様を包含し得る。従って、任意の1つのエレメントまたはエレメントの組み合わせを含む本発明の各々の限定が、本発明の各局面に含まれ得ることが理解される。

**【0026】**

(発明の詳細な説明)

1つの局面において、本発明は、CpG含有核酸のS立体異性体が、R立体異性体またはその混合物よりも、免疫刺激効果を媒介する際により効果的であるという知見に関する。これらの知見は、特に、部分的に、優先的にまたは完全にS立体異性体からなるCpG調製物のより低い用量の使用を可能にする。

**【0027】**

CpG含有核酸は、癌、感染性疾患、アレルギー、ぜん息および他の障害を処置するため、ならびに癌の化学療法後の日和見感染に対する防御を補助するため免疫系を刺激する、新規な治療組成物および予防組成物であることが見出された。さらに強力な平衡化された、CpGの刺激に起因する細胞性免疫応答および体液性免疫応答は、侵入してくる病原および癌細胞に対する身体自身の自然な防御系を反映する。CpG配列は、ヒトDNAにおいては比較的稀であるが、細菌のような感染生物のDNAにおいて、一般に見出される。ヒト免疫系は、感染の初期の危険信号としてCpG配列を認識し、そして他の免疫刺激剤に頻繁に見られるような有害な反応を引き起こすことなく、侵入してくる病原に対して急速かつ強力な免疫応答を開始するように、明らかに進化している。従って、CpG含有核酸は、この先天免疫防御機構に依存して、免疫療法のための独特かつ自然の経路を利用し得る。免疫調節に対するCpG核酸の効果は、本特許出願の発明者により発見され、そして例えば、以下のような同時係属中の特許出願において広範に記載されている：米国特許出願番号：08/386,063（1995年2月7日出願）（および関連PCT US95/01570）；08/738,6

52(1996年10月30日出願) ; 08/960, 774(1997年10月30日出願) (および関連PCT/US97/19791、WO98/18810) ; 09/191, 170(1998年11月13日出願) ; 09/030, 701(1998年2月25日出願) (および関連PCT/US98/03678) ; 09/082, 649(1998年5月20日出願) (および関連PCT/US98/10408) ; 09/325, 193(1999年6月3日出願) (および関連PCT/US98/04703) ; 09/286, 098(1999年4月2日出願) (および関連PCT/US99/07335) ; 09/306, 281(1999年5月6日出願) (および関連PCT/US99/09863)。これらの特許および特許出願の各々の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0028】

本発明の知見は、上記のCpG含有核酸の使用およびCpG核酸についての任意の他の公知の使用の全てに適用可能である。本発明は、Sキラリティーを有する改変リン酸骨格を有するCpGオリゴヌクレオチドが、RキラルオリゴヌクレオチドおよびSキラルオリゴヌクレオチドの混合物またはRキラリティーを有するオリゴヌクレオチドよりも優れた免疫活性特性を有するという発見に関する。従って、本発明は、Sキラリティーを有するCpGオリゴヌクレオチドを用いて免疫系を刺激する任意の方法に有用である。

#### 【0029】

CpGオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドは、非メチル化シトシン-アミニジヌクレオチド配列を含有する核酸分子(すなわち、「CpG-DNA」すなわち5'シトシンに続いて3'グアノシンを含有し、かつこれらがリン酸結合により連結されたDNA)であり、そして免疫系を活性化する。CpGオリゴヌクレオチドは、二本鎖または一本鎖であり得る。一般的に、二本鎖分子は、インビボにおいてより安定であるが、一方、一本鎖分子は、増強された免疫活性を有する。従って、本発明のいくつかの局面において、オリゴヌクレオチドは、一本鎖であ

ることが好ましく、そして他の局面においてオリゴヌクレオチドは、二本鎖であることが好ましい。用語CpGオリゴヌクレオチドまたはCpG核酸は、本明細書中で使用される場合、他に示さない限り、免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチドまたは免疫刺激性CpG核酸をいう。

### 【0030】

用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、複数のヌクレオチド（すなわち、リン酸基および交換可能な有機塩基に連結された糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含む分子であり、これは、置換されたピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）またはウラシル（U））または置換されたプリン（例えば、アデニン（A）またはグアニン（G））のいずれかである）を意味するために交換可能に使用される。本明細書中で使用される場合、この用語は、オリゴリボヌクレオチドおよびオリゴデオキシリボヌクレオチドをいう。この用語はまた、ポリヌクレオシド（すなわち、ポリヌクレオチドからリン酸を除いたもの）および任意の他の有機塩基を含有するポリマーを含む。核酸分子は、存在する核酸供給源（例えば、ゲノムまたはcDNA）から得られ得るが、合成（例えば、オリゴヌクレオチド合成により生成される）が好ましい。CpGオリゴヌクレオチド全体は、非メチル化され得るか、または一部が非メチル化され得るが、少なくとも5' CG 3' のCは、非メチル化されるべきである。

### 【0031】

1つの好ましい実施態様において、本発明は、少なくとも以下の式：

5' X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3'

によって表されるCpGオリゴヌクレオチドを提供し、  
ここでX<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、およびX<sub>4</sub>は、ヌクレオチドである。1つの実施態様において、X<sub>2</sub>はアデニン、グアニン、またはチミンである。別の実施態様において、X<sub>3</sub>は、シトシン、アデニン、またはチミンである。

### 【0032】

別の実施態様において、本発明は、少なくとも以下の式：

5' N<sub>1</sub> X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> N<sub>2</sub> 3'

によって表される単離されたCpGオリゴヌクレオチドを提供し、

ここで $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、および $X_4$ はヌクレオチドであり、そして $N$ は任意のヌクレオチドであり、そして $N_1$ および $N_2$ は、それぞれ約0～25Nからなる核酸配列である。1つの実施態様において、 $X_1 X_2$ は、G p T、G p G、G p A、A p A、A p T、A p G、C p T、C p A、C p G、T p A、T p T、およびT p Gからなる群より選択されるヌクレオチドであり；そして $X_3 X_4$ は、T p T、C p T、A p T、T p G、A p G、C p G、T p C、A p C、C p C、T p A、A p A、およびC p Aからなる群より選択されるヌクレオチドである。好ましくは、 $X_1 X_2$ は、G p AまたはG p Tであり、そして $X_3 X_4$ は、T p Tである。他の実施態様において、 $X_1$ もしくは $X_2$ 、または両方はプリンであり、かつ $X_3$ もしくは $X_4$ 、または両方はピリミジンであるか、あるいは $X_1 X_2$ は、G p Aでありかつ $X_3$ もしくは $X_4$ 、または両方はピリミジンである。別の好ましい実施態様において、 $X_1 X_2$ は、T p A、A p A、A p C、A p G、およびG p Gからなる群より選択されるヌクレオチドである。なお別の実施態様において、 $X_3 X_4$ は、T p T、C p T、T p A、T p G、A p A、A p G、G p A、およびC p Aからなる群より選択されるヌクレオチドである。別の実施態様における $X_1 X_2$ は、T p T、T p G、A p T、G p C、C p C、C p T、T p C、G p T、およびC p Gからなる群より選択されるヌクレオチドであり； $X_3$ は、AおよびTからなる群より選択されるヌクレオチドであり、そして $X_4$ はヌクレオチドであるが、ここで $X_1 X_2$ が、T p C、G p T、またはC p Gである場合、 $X_3 X_4$ はT p C、A p T、またはA p Cでない。

### 【0033】

別の実施態様において、 $N_1$ および $N_2$ の核酸は、CCGGもしくはCGCGの四量体を含まないか、またはCCGもしくはCGGのトリマーの1より多くを含まない。CCGGもしくはCGCGの四量体、またはCCGもしくはCGGのトリマーの1より多くの効果は、オリゴヌクレオチド骨格の状態に部分的に依存する。合成オリゴヌクレオチドは、いくつかの実施態様において、5'末端および/または3'末端で、あるいは5'末端および/または3'末端の近傍で、CCGGもしくはCGCGの四量体、またはCCGもしくはCGGのトリマーの1より多くを含まないかもしれない。例えば、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエス

テル骨格またはキメラ骨格を有する場合、そのオリゴヌクレオチドにおいて、これらの配列を含むことは、オリゴヌクレオチドの生物学的活性への任意の影響がある場合、最小限のことには過ぎない。この骨格が、完全にホスホロチオエート（または他のリン酸修飾）であるか、または有意にホスホロチオエートであるならば、これらの配列を含むことは、生物学的活性または生物学的活性の反応速度論により影響を有し得る。CpGオリゴヌクレオチドが、核酸ベクターにコードされている抗原と組み合わせて投与される場合、CpGオリゴヌクレオチドの骨格は、ホスホジエステルおよびホスホロチオエート（または他のリン酸修飾）のキメラ的な組合せであることが好ましい。細胞は、完全なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの存在下で、プラスミドベクターを取り込むという問題を有し得る。従って、ベクターおよびオリゴヌクレオチドの両方が被験体に投与される場合、オリゴヌクレオチドがキメラ骨格を有するか、またはホスホロチオエート骨格を有することが好ましいが、プラスミドが細胞に直接的にそれを送達するビヒクルと結合し、従って、細胞の取り込みの必要を避けることが好ましい。このようなビヒクルは当業者に公知であり、そして、例えば、リポソームおよび遺伝子銃を含む。

#### 【0034】

別的好ましい実施態様において、CpGオリゴヌクレオチドは、配列5' T C N<sub>1</sub> T X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> C G X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> 3' を有する。本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施態様において、G p T、G p G、G p A、およびA p Aからなる群より選択されるX<sub>1</sub> X<sub>2</sub> を含み、そしてX<sub>3</sub> X<sub>4</sub> は、T p T、C p T、およびT p Cからなる群より選択される。

#### 【0035】

細胞への取り込みを容易にするために、CpG含有オリゴヌクレオチドは、好ましくは、8～100塩基長の範囲にある。しかし、8ヌクレオチドより大きい任意のサイズ（k b長でさえ多い）の核酸は、十分な免疫刺激モチーフが存在する場合、本発明に従う免疫応答を誘導し得る。なぜなら、より大きい核酸は、細胞内部でオリゴヌクレオチドに分解されるからである。好ましくは、CpGオリゴヌクレオチドは、8と100との間の範囲にあり、そしていくつかの実施態様

においては、8と30との間のヌクレオチドのサイズである。

#### 【0036】

「パリンドローム配列」は、逆向きの反復を意味する（すなわち、A B C D E E' D' C' B' A' のような配列であり、ここでAとA'は、通常のW a t s o n-C r i c k 塩基対を形成し得る塩基である）。インビポにおいて、このような配列は、二重鎖構造を形成し得る。1つの実施態様において、C p Gオリゴヌクレオチドは、パリンドローム配列を含む。この文脈において使用されるパリンドローム配列は、C p Gがパリンドロームの一部であり、そして好ましくは、C p Gパリンドロームの中心であるようなパリンドロームをいう。別の実施態様において、C p Gオリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含まない。パリンドロームを含まないC p Gオリゴヌクレオチドは、C p Gジヌクレオチドがパリンドロームの一部ではない、パリンドロームである。このようなオリゴヌクレオチドは、C p Gがパリンドロームの中心ではないパリンドロームを含む。

#### 【0037】

本発明のC p G核酸配列は、広く上記に記載されるもの、ならびに、それぞれ、1995年2月7日および1997年10月30日に出願された、米国出願番号08/386, 063および08/960, 774に対する優先権を主張する、PCT公開特許出願PCT/US95/01570およびPCT/US97/19791において開示されるものである。例示的な配列は、表1に示される免疫刺激の配列を含むがこれらに限定されない。

#### 【0038】

##### 【表1】

GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 1)
GCTAGATGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 2)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 3)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 4)
GCATGACGTTGAGCT;	(SEQ ID NO: 5)
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 6)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 7)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 8)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 9)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 10)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 11)
GAGAACGCTCGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 12)
GAGAACGCTCGACCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 13)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 14)
GAGAACGATGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 15)
GAGAACGCTCCAGCACTGAT;	(SEQ ID NO: 16)
TCCATGTCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 17)
TCCATGTCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 18)
TCCATGACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 19)
TCCATGTCGGTCCCTGATGAT;	(SEQ ID NO: 20)
TCAACGTT;	(SEQ ID NO: 21)
TCAGCGCT;	(SEQ ID NO: 22)
TCATCGAT;	(SEQ ID NO: 23)
TCTTCGAA;	(SEQ ID NO: 24)
CAACGTT;	(SEQ ID NO: 25)
CCAACGTT;	(SEQ ID NO: 26)
AACGTTCT;	(SEQ ID NO: 27)
TCAACGTC;	(SEQ ID NO: 28)
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 29)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 30)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 31)
ATGGAGGCTCCATCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 32)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 33)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 34)
TCCATGTCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 35)
TCCATGCCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 36)
TCCATGGCGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 37)
TCCATGACGGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 38)
TCCATGTCGATCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 39)
TCCATGTCGCTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 40)

## 表1の続き

TCCATGTCGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 41)
TCCATGACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 42)
TCCATAACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 43)
TCCATGACGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 44)
TCCATCACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 45)
GGGGTCAACGTTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 46)
GGGGTCAGTCGTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 47)
GCTAGACGTTAGTGT;	(SEQ ID NO: 48)
TCCATGTCGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 49)
ACCATGGACGATCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 50)
TCTCCCAGCGTGCGCCAT;	(SEQ ID NO: 51)
ACCATGGACGAACTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 52)
ACCATGGACGAGCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 53)
ACCATGGACGACCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 54)
ACCATGGACGTACTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 55)
ACCATGGACGGTCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 56)
ACCATGGACGTTCTGTTCCCCCTC;	(SEQ ID NO: 57)
CACGTTAGGGGCAT;	(SEQ ID NO: 58)
TCAGCGTGCGCC;	(SEQ ID NO: 59)
ATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 60)
TCTCCCAGCGGGCGCAT;	(SEQ ID NO: 61)
TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 62)
TCCATAGCGTTCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 63)
TCGTCGCTGTCCTCCCTTCCTT;	(SEQ ID NO: 64)
TCCTGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 65)
T CCTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 66)
TCCATGTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 67)
T CCTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 68)
T CCTTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 69)
T CCTGTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 70)
TCGTCGCTGTCGCTCCCTTCCTT;	(SEQ ID NO: 71)
TCGTCGCTGTTGTCGTTTCCTT;	(SEQ ID NO: 72)
TCCATGCGTGCCTGCGTTTT;	(SEQ ID NO: 73)
TCCATGCGTGCCTGCGTT;	(SEQ ID NO: 74)
TCCACGACGTTTCGACGTT;	(SEQ ID NO: 75)
TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 76)
TCGTCGTTTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 77)
TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 78)
GCCTGCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 79)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 80)

## 表1の続き

TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 81)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 82)
TCGTCGTCGTCGTT;	(SEQ ID NO: 83)
TGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 84)
TCCATAGCGTCTCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 85)
TCCATGACGTTCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 86)
GTCGYT;	(SEQ ID NO: 87)
TGTCGYT;	(SEQ ID NO: 88)
AGCTATGACGTTCCAAGG;	(SEQ ID NO: 89)
TCCATGACGTTCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 90)
ATCGACTCTCGAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 91)
TCCATGTCGGTCTGACGCA;	(SEQ ID NO: 92)
TCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 93)
ATAGGAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 94) ..

本発明における使用のために、核酸（S キラル核酸およびR キラル核酸の両方）が、当該分野で周知の多数の手順のいずれかを用いて新規に合成され得る。例えば、b-シアノエチルホスホルアミダイト法（Beaucage, S. L., およびCaruthers, M. H., Tet. Let. 22: 1859, 1981）；ヌクレオシドH-ホスホネート法（Gareggら、Tet. Let. 27: 4051-4054, 1986; Froehlerら、Nucl. Acid. Res. 14: 5399-5407, 1986, ; Gareggら、Tet. Let. 27: 4055-4058, 1986, Gaffneyら、Tet. Let. 29: 2619-2622, 1988）。これらのケミストリーは、市販されている種々の自動オリゴヌクレオチド合成機によって行われ得る。これらのオリゴヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドといわれる。あるいは、CpGジヌクレオチドは、プラスミド中で大規模で產生され得（Sambrook, T. ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989を参照のこと）、そして小さい部分に分けられるか、または全体が投与される。オリゴヌクレオチドは、制限酵素、エキソヌクレアーゼ、またはエンドヌクレアーゼを使用する技術のような、公

知の技術を使用して、既存の核酸配列（例えば、ゲノムまたはcDNA）から調製され得る。この様式において調製されるオリゴヌクレオチドは、単離されたオリゴヌクレオチドといわれる。用語CpGオリゴヌクレオチドまたはCpG核酸（Sキラル核酸およびRキラル核酸の両方）は、合成のCpGオリゴヌクレオチドおよび単離されたCpGオリゴヌクレオチドの両方を含む。

#### 【0039】

インビボでの使用のために、核酸（Sキラル核酸およびRキラル核酸の両方）は、好ましくは、分解に対して比較的耐性である（例えば、安定化される）。「安定化された核酸分子」は、インビボでの分解（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを介する分解）に比較的耐性である核酸分子を意味する。安定化は、長さまたは二次構造の関数である。10～数百kb長のメチル化されていないCpGオリゴヌクレオチドは、インビボでの分解に比較的耐性である。より短いCpGオリゴヌクレオチドについては、二次構造がこの効果を安定化および増加させ得る。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端が上流の領域に対して自己相補性を有するならば、その結果、それは再折り畳みされ得、そして一種のステムループ構造を形成し、次いでオリゴヌクレオチドは安定となり、従つてより活性を示す。

#### 【0040】

あるいは、核酸の安定化は、リン酸骨格の修飾を介して達成され得る。本発明の好ましい安定化オリゴヌクレオチドは、修飾された骨格を有する。オリゴヌクレオチド骨格の修飾は、インビボで投与された場合に、CpGオリゴヌクレオチドの増強された活性を提供することが実証された。これらの安定化された構造は、本発明のキラルCpG分子が少なくとも部分的に修飾された骨格を有するので、好ましい。オリゴヌクレオチドの5'末端において少なくとも2つのホスホロチオエート結合および3'末端において複数のホスホロチオエート結合を含むCpG構築物は、好ましくは5は、最大活性を提供し、そして細胞内エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼによる分解からオリゴヌクレオチドを保護する。他の修飾されたオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル修飾されたオリゴヌクレオチド、ホスホジエステルの組合せ、およびホスホロチオエートオリゴヌク

レオチド、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびそれらの組合せを含む。これらの組合せの各々および免疫細胞上のそれらの特定の効果は、1995年2月7日および1997年10月30日にそれぞれ出願された、米国特許出願番号08/386,063および08/960,774に対する優先権を主張する、PCT公開特許出願PCT/US95/01570およびPCT/US97/19791においてより詳細に議論され、これらの全体の内容は本明細書によって参考として援用される。これらの修飾したオリゴヌクレオチドは、増強されたヌクレアーゼ耐性、増加された細胞の取り込み、増加されたタンパク質結合、および/または変化した細胞内局在に起因して、より刺激活性を示し得る。

#### 【0041】

ホスホロチオエートのような改変された骨格は、ホスホルアミデートまたはH-ホスホネートケミストリーのいずれかを利用する自動化技術を用いて合成され得る。アリールおよびアルキルホスホネートは、例えば、米国特許第4,469,863号に記載されるように作製され得；そしてアルキルホスホトリエステル（ここで荷電した酸素部分は、米国特許第5,023,243号および欧州特許第092,574号に記載されるようにアルキル化される）は、市販の試薬を使用して、自動化固相合成によって調製され得る。他のDNA骨格修飾体および置換体の生成方法が記載されている（Uhlmann, E. およびPeyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Biocconjugate Chem. 1:165, 1990）。

#### 【0042】

CpGモチーフを含むホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよびホスホジエステルオリゴヌクレオチドの両方は、免疫細胞中で活性である。しかし、CpG特異的効果を誘導するために必要とされる濃度に基づいて、ヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエート骨格CpGオリゴヌクレオチドは、より強力である（ホスホロチオエートについて $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に対し、ホスホジエステルについて合計 $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

#### 【0043】

他の安定化されたオリゴヌクレオチドには、非イオン性DNAアナログ（例えば、アルキル-およびアリール-ホスフェート（ここで、荷電したホスホネート酸素がアルキル基またはアリール基によって置換されている））、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル（ここで、荷電した酸素部分がアルキル化されている）が挙げられる。いずれかまたは両方の末端でジオール（例えば、テトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコール）を含むオリゴヌクレオチドはまた、ヌクレアーゼ分解に実質的に耐性であることが示される。

#### 【0044】

本発明に従って有用なCpGオリゴヌクレオチドは、SキラルまたはRキラルCpGオリゴヌクレオチドである。本明細書中で使用される場合、「SキラルCpGオリゴヌクレオチド」とは、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格修飾を有し、かつ複数のキラル中心がSキラリティーを有するCpG核酸である。本明細書中で使用される「RキラルCpGオリゴヌクレオチド」とは、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格修飾を有し、かつ複数のキラル中心がRキラリティーを有するCpG核酸である。骨格修飾は、キラル中心を形成する任意の型の修飾であり得る。その修飾は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびそれらの組合せを含むがこれらに限定されない。

#### 【0045】

キラルCpGオリゴヌクレオチドは、骨格修飾を有するオリゴヌクレオチド中に少なくとも2つのヌクレオチドを有さなくてはならない。しかし、オリゴヌクレオチド中のすべてのヌクレオチドまたはすべてより少ないヌクレオチドが、修飾された骨格を有し得る。修飾された骨格を有するヌクレオチドの（キラル中心といわれる）、複数が单一のキラリティー、SまたはRを有する。本明細書中で使用される場合、「複数」とは、50%より多い量をいう。従って、複数のキラル中心がSキラリティーまたはRキラリティーを有する限り、すべてより少ないキラル中心は、SキラリティーまたはRキラリティーを有し得る。いくつかの実施態様において、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のキラル中心がSキラリティーまた

はRキラリティーを有する。他の実施態様において、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のヌクレオチドが骨格修飾を有する。

#### 【0046】

SキラルおよびRキラルCpGオリゴヌクレオチドは、キラル的に純粋なオリゴヌクレオチドを產生するための当該分野で公知の任意の方法によって調製され得る。多くの参考文献（例えば、実施例で引用されるStecらの文献、これは、オキサチアホスホラン（oxathiaaphospholane）法を使用して、立体的に純粋なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを产生する方法を教示する）が公開されている（Stec, W. J. ら、1995, J. Am. Chem. Soc., 117: 12019）。キラル的に純粋なオリゴヌクレオチドを作製する他の方法は、ISIS Pharmaceuticalsのような会社によって記載されている。米国特許はまたこれらの方法を記載する。例えば、米国特許第5883237号；同第5837856号；同第5599797号；同第5512668号；同第5856465号；同第5359052号；同第5506212号；同第5521302号；および同第5212295号、これらのそれぞれは、その全体が参考として本明細書によって援用され、立体的に純粋なオリゴヌクレオチドを生成するための方法を開示する。

#### 【0047】

SキラルCpGオリゴヌクレオチドは、感染性の生物との感染または特定の癌抗原が同定されてきた癌、あるいはアレルゲンまたはぜん息に対する素因が既知であるアレルギーまたはぜん息を発症する危険がある被験体の処置のための予防的ワクチンとして、本発明のいくつかの局面において有用である。SキラルCpGオリゴヌクレオチドはまた、感染、アレルギー、または癌に対する短期の保護について抗原またはアレルゲンなしで与えられ得、そしていくつかの場合には、反復用量が長期の保護を可能にする。本明細書中で使用される場合、「危険がある被験体」とは、感染を引き起こす病原体にさらされることの危険を有するか、または癌もしくはアレルゲンもしくは癌を発症する危険を有する被験体である。例えば、危険がある被験体は、特定の型の感染性薬剤が見出されている地域に旅

行する予定である被験体であり得、あるいは、その被験体は、ライフスタイルまたは医学的手順によって、感染性生物を含み得る体液にさらされる被験体、または感染性生物またはアレルゲンが同定されている地域において生活している任意の被験体でさえあり得る。感染を発症する危険にある被験体はまた、医療機関が特定の感染性生物抗原を用いるワクチン投与を推奨する一般的な集団を含む。その抗原はアレルゲンであり、そしてその被験体はその特定の抗原に対するアレルギー反応を発症し、そしてその被験体はその抗原にさらされ得（すなわち、花粉の季節）、次いで、その患者は、抗原にさらすことの危険がある。ぜん息に対するアレルギーを発症する危険がある患者には、アレルギーまたはぜん息を有すると同定されたが、CpG処置の間に活性な疾患を有さない患者、ならびに遺伝的または環境的因素によりこれらの疾患を発症する危険があると考えられる被験体が含まれる。

#### 【0048】

癌を発症する危険がある被験体は、癌を発症する高い可能性を有する被験体である。これらの被験体には、例えば、遺伝的な異常（その存在が癌を発症する高い可能性に関して相関を有することが実証されている）を有する被験体、および発癌剤（例えば、タバコ、アスベスト、または他の化学的毒素）にさらされた被験体、または癌について以前に処置され、そして見かけの寛解にある被験体が含まれる。癌を発症する危険がある被験体が、その被験体が発症する危険がある癌の型について特異的な抗原で処置される場合、SキラルCpGオリゴヌクレオチド被験体は、その癌が発症した場合に、それを殺傷し得る。被験体において腫瘍が形成され始める場合、その被験体は、腫瘍抗原に対して特定の免疫応答を発生させる。

#### 【0049】

予防的処置のためのCpGオリゴヌクレオチドの使用に加えて、本発明はまた、感染、アレルギー、ぜん息、または癌を有する被験体の処置のためのCpGオリゴヌクレオチドの使用を包含する。

#### 【0050】

「感染を有する被験体」とは、感染性の病原体にさらされ、そして身体中で病

原体の急性または慢性の検出可能なレベルを有する被験体をいう。CpGオリゴヌクレオチドは、感染性の病原体のレベルを減少させ得るか、または感染性の病原体を全滅させ得る、抗原特異的粘膜免疫応答を上昇させるために抗原とともに使用され得る。本明細書中で使用される場合、感染性疾患とは、身体における外来性の微生物の存在から生じる疾患である。病原体の最初の進入の部位である、身体の粘膜表面を保護するための有効なワクチンストラテジーおよび処置を開発することが特に重要である。

#### 【0051】

「アレルギーを有する被験体」とは、アレルゲンに応答してアレルギー反応を有するか、またはそのようなアレルギー反応を発症する危険がある被験体をいう。「アレルギー」とは、物質（アレルゲン）に対する後天的な過敏症をいう。アレルギー状態には、湿疹、アレルギー性鼻炎もしくはコリーザ、枯草熱、結膜炎、気管支ぜん息、じんま疹（urticariaもしくはhives）、および食物アレルギー、ならびに他のアトピー性状態が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0052】

現在、アレルギー疾患は、一般に、低用量の抗原の注射、次いで、続く増加する用量の抗原の注射により処置される。この手順は、アレルゲンに対する寛容を誘導し、さらなるアレルギー反応を予防すると考えられている。しかし、これらの方法は、有効となるまでに数年を要し得、そしてアナフィラキシーショックのような副作用の危険性を伴う。本発明の方法はこれらの問題を回避する。

#### 【0053】

アレルギーは、一般に、無害なアレルゲンに対するIgE抗体の生成によって引き起こされる。非メチル化CpGオリゴヌクレオチドの粘膜投与によって誘導されるサイトカインは、主に、「Th1」と呼ばれるクラス（例としては、IL-12およびIFN- $\gamma$ である）であり、そしてこれらは、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘導する。Th1応答に関連する抗体の型は、一般に、より防御的である。なぜなら、これらは、高い中和能力およびオプソニン作用能力を有するからである。他の主要な型の免疫応答は、Th2免疫応答と呼ばれ

、これはIL-4、IL-5およびIL-10サイトカインの産生に関連する。

T<sub>h</sub>2応答は主に抗体を含み、そしてこれらは、感染に対して、より少ない防御的効果を有し、そしていくつかのT<sub>h</sub>2アイソタイプ（例えば、IgE）は、アレルギーに関連する。一般に、アレルギー疾患は、T<sub>h</sub>2型免疫応答によって媒介され、一方、T<sub>h</sub>1応答は感染に対する最良の防御性を提供するが、過剰なT<sub>h</sub>1応答は、自己免疫疾患に関連するようである。被験体における免疫応答をT<sub>h</sub>2応答（これはIgE抗体の産生およびアレルギーに関連する）からT<sub>h</sub>1応答（これはアレルギー反応に対して防御的である）へシフトさせるCpGオリゴヌクレオチドの能力に基づいて、免疫応答を誘導するために有効な用量のCpGオリゴヌクレオチドを被験体へ投与して、アレルギーを処置または予防し得る。

#### 【0054】

従って、CpGオリゴヌクレオチドは、アレルギー状態および非アレルギー状態（例えば、喘息）の処置において有意な治療的有用性を有する。T<sub>h</sub>2サイトカイン、特にIL-4およびIL-5は、喘息の被験体の気道において上昇される。これらのサイトカインは、喘息の炎症性応答の重要な局面（IgEアイソトープ転換、好酸球走化性および好酸球活性化、ならびに肥満細胞増殖を含む）を促進する。T<sub>h</sub>1サイトカイン、特にIFN-γおよびIL-12は、T<sub>h</sub>2クローニングの形成およびT<sub>h</sub>2サイトカインの産生を抑制し得る。「喘息」とは、炎症によって特徴付けられる呼吸器系の障害（気道の狭窄および吸入物質に対する気道の反応性の増大）をいう。喘息は、全面的にではないが頻繁に、アトピー性症状またはアレルギー性症状に関連する。

#### 【0055】

「癌を有する被験体」は、検出可能な癌性細胞を有する被験体である。この癌は、悪性の癌であってもよいし、悪性でない癌であってもよい。癌または腫瘍には、以下が挙げられるがこれらに限定されない：胆管癌；脳の癌；乳癌；頸部癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；上皮内新生物；リンパ腫；肝臓癌；肺癌（例えば、小細胞および非小細胞）；黒色腫；神経芽細胞腫；口腔癌（oral cancer）；卵巣癌；脾臓癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫；皮膚癌；精巣癌；甲状腺癌；および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫。

**【0056】**

「被験体」とは、ヒト、またはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、靈長類（例えば、サル）、魚（養殖漁業種）（例えば、サケ）、ラットおよびマウスを含むが、これらに限定されない脊椎動物を意味する。

**【0057】**

被験体は抗原に曝露される。本明細書で使用される場合、用語「～に曝露される（する）」とは、インビボで、被験体を抗原と接触させる能動的な工程または抗原への被験体の受動的曝露のいずれかをいう。被験体を抗原に能動的に曝露するための方法は、当該分野において周知である。一般に、抗原は、任意の手段（例えば、静脈内、筋肉内、経口、経皮、粘膜、鼻腔内、気管内、または皮下投与）によって被験体に直接的に投与される。抗原は、全身的または局所的に投与され得る。抗原およびS-キラルCpGオリゴヌクレオチドを投与するための方法は、以下でより詳細に記載される。被験体は、抗原が身体内の免疫細胞への曝露に利用可能となる場合に、抗原に受動的に曝露される。被験体は、例えば、外来病原体のその身体への進入によって、または外来抗原を細胞表面に発現する腫瘍細胞の発生によって、抗原に受動的に曝露され得る。

**【0058】**

被験体を抗原に受動的に曝露する方法は、特に、S-キラルCpGオリゴヌクレオチドの投与の時期に依存し得る。例えば、癌もしくは感染疾患またはアレルギー応答もしくは喘息応答を発症する危険性がある被験体において、この被験体は、その危険性が最も高い時期（すなわち、アレルギーの季節の間または癌誘導因子（cancer causing agent）への曝露の後）に、規則的にS-キラルCpGオリゴヌクレオチドを投与され得る。さらに、このCpGオリゴヌクレオチドは、旅行者が病原菌に曝露される危険性がある外国に旅行する前に、その旅行者に投与され得る。同様に、S-キラルCpGオリゴヌクレオチドは、生物戦争（biowarfare）に曝露される危険性のある軍人または民間人に投与されて、その被験体が抗原に曝露される時および場合に、この抗原に対する粘膜免疫応答を誘導し得る。

**【0059】**

本明細書中で使用される「抗原」は、免疫応答を引き起こし得る分子である。

抗原としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖、多糖結合体、多糖および他の分子のペプチド模倣物および非ペプチド模倣物、低分子、脂質、糖脂質、炭水化物、ウイルスおよびウイルス抽出物、ならびに多細胞生物（例えば、寄生生物およびアレルゲン）。用語抗原は、宿主免疫系によって外来であるとして認識される任意の型の分子を広範に含む。抗原としては、癌抗原、微生物抗原、およびアレルゲンが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0060】

本明細書中で使用される「癌抗原」は、腫瘍または癌細胞の表面に会合する化合物（例えば、ペプチドまたはタンパク質）であり、そしてこの化合物は、MHC分子に関連する抗原提示細胞の表面上に発現された場合に免疫応答を引き起こし得る。癌抗原は、癌細胞の粗抽出物を調製すること（例えば、Cohenら、1994, Cancer Research, 54: 1055に記載されるように）、これらの抗原を部分的に精製すること、組換え技術、または既知の抗原のデノボ合成のいずれかによって、癌細胞から調製され得る。癌抗原としては、組換え的に発現された腫瘍もしくは癌の免疫原性部分、または腫瘍全体もしくは癌全体である抗原が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗原は、単離され得るか、または組換え的にもしくは当該分野で公知の任意の他の手段によって調製され得る。

#### 【0061】

本明細書中で使用される「微生物抗原」は、微生物の抗原であり、そしてこれは、ウイルス、細菌、寄生生物、および真菌を含むがこれらに限定されない。このような抗原は、インタクトな微生物、ならびに天然の単離物、およびそれらのフラグメントもしくは誘導体を含み、そしてまた、天然の微生物抗原に対して同一または類似する合成化合物を含む。これらの抗原は、微生物に対して特異的な免疫応答を誘導する。化合物が天然の微生物抗原に対して免疫応答（体液性および/または細胞性）を誘導する場合、この化合物は天然の微生物抗原に類似する。このような抗原は、当該分野において慣用的に使用され、そして当業者に周知

である。

### 【0062】

ヒトにおいて見出されているウイルスの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：*Retroviridae*（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、HIV-1 (HTLV-III)、LAVもしくはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIともいわれる）；および他の分離株、例えば、HIV-LP）；*Picornaviridae*（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、ECHOウイルス）；*Caliciviridae*（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；*Togaviridae*（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；*Flaviviridae*（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；*Coronoviridae*（例えば、コロナウイルス）；*Rhabdoviridae*（例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；*Coronaviridae*（例えば、コロナウイルス）；*Rhabdoviridae*（例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；*Filoviridae*（例えば、エボラウイルス）；*Paramyxoviridae*（例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルス）；*Orthomyxoviridae*（例えば、インフルエンザウイルス）；*Bunyaviridae*（例えば、ハンターンウイルス、ブンヤウイルス（bungavirus）、フレボウイルスおよびナイロウイルス（Nairovirus））；*Arenaviridae*（出血熱ウイルス）；*Reoviridae*（例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；*Birnaviridae*；*Hepadnaviridae*（B型肝炎ウイルス）；*Parvoviridae*（パルボウイルス）；*Papovaviridae*（乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス）；*Adenoviridae*（大半のアデノウイルス）；*Herpesviridae*（単純ヘルペスウイルス（HSV）1および2、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス）；*Poxviridae*（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；および*Iridoviridae*（例えば、アフリカ豚

コレラウイルス) ; ならびに分類されていないウイルス (例えば、海綿状脳障害の病因論的因素、デルタ型肝炎の因子 (B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる) 、非A型非B型肝炎の因子 (クラス1=内部伝播; クラス2=非経口伝播) (すなわち、C型肝炎) ; ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス (astrovirus))。

### 【0063】

グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌はともに、脊椎動物において抗原として作用する。このようなグラム陽性細菌としては、*Pasteurella*種、*Staphylococci*種、および*Streptococcus*種が挙げらるがこれらに限定されない。グラム陰性細菌としては、*Escherichia coli*、*Pseudomonas*種、および*Salmonella*種が挙げられるがこれらに限定されない。感染性細菌の具体的な例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない。

### 【0064】

#### 【化1】

*Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic spp.)*, *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus antrachis*, *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium* sp., *Erysipelothrrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, および *Actinomyces israelii*.

真菌の例としては、以下が挙げられる: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*。他の感染性生物体 (すなわち、原生生物) としては以下が挙げら

れる: *Plasmodium* (例えば、*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, ならびに*Plasmodium vivax*および*Toxoplasma gondii*)。

#### 【0065】

他の医療的に適切な微生物は、文献において広範に記載されている（例えば、C. G. A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983（この内容全体は、参考として本明細書中に援用される）を参照のこと）。

#### 【0066】

上記の微生物抗原の多くはヒト障害に関連するが、本発明はまた、他の非ヒト脊椎動物を処置するために有用である。非ヒト脊椎動物はまた、本明細書中に開示されるCpGオリゴヌクレオチドを用いて予防または処置し得る感染を発症し得る。例えば、感染性のヒト疾患の処置に加えて、本発明の方法は、動物の感染を処置するために有用である。

#### 【0067】

本明細書中で使用される場合、「処置」、「処置された」、または「処置する」という用語は、感染性疾患に関して使用された場合は、被験体（感染の危険がある被験体）の病原体による感染に対する抵抗性を増す、言い換えれば、被験体が病原体によって感染する見込みを減少させる予防的処置、および被験体（感染した被験体）が感染した後、感染と闘うため（例えば、感染を減少または除去する、または悪化するのを防止するため）の処置をいう。

#### 【0068】

非ヒト脊椎動物の処置のための多くのワクチンが、Bennett, K. Compendium of Veterinary Products、第3版、North American Compendiums, Inc.、1995で開示されている。上記で論じたように、抗原は、天然の供給源からまたは合成的に得られた、ウイルス、細菌および真菌のような感染性の微生物、およびそのフラグメントを含む。ヒトおよび非ヒト脊椎動物の感染性ウイルスはどちらも、

レトロウイルス、RNAウイルス、およびDNAウイルスを含む。レトロウイルスのこのグループは、単純レトロウイルスおよび複雑なレトロウイルスをどちらも含む。単純レトロウイルスは、B型レトロウイルス、C型レトロウイルスおよびD型レトロウイルスのサブグループを含む。B型レトロウイルスの例は、マウス乳腺癌ウイルス (MMTV) である。C型レトロウイルスは、サブグループのC型グループA (ラウス肉腫ウイルス (RSV)、トリ白血病ウイルス (ALV) )、およびトリ骨髓芽球症ウイルス (AMV) を含む)、およびC型グループB (マウス白血病ウイルス (MLV)、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、マウス肉腫ウイルス (MSV)、テナガザル白血病ウイルス (GALV)、脾臓壊死ウイルス (SNV)、細網内皮症ウイルス (RV)、およびサル肉腫ウイルス (SV) を含む) を含む。D型レトロウイルスは、マソンーファイザーサルウイルス (MPMV) およびサルレトロウイルス1型 (SRV-1) を含む。複雑なレトロウイルスは、レンチウイルス、T細胞白血病ウイルスおよび泡沢状ウイルスのサブグループを含む。レンチウイルスは、HIV-1を含むが、またHIV-2、SIV、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、およびウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV) を含む。T細胞白血病ウイルスは、HTLV-I、HTLV-II、サルT細胞白血病ウイルス (STLV)、およびウシ白血病ウイルス (BLV) を含む。泡沢状ウイルスは、ヒト泡沢状ウイルス (HFV)、サル泡沢状ウイルス (SFV)、およびウシ泡沢状ウイルス (BFV) を含む。

#### 【0069】

脊椎動物において抗原である他のRNAウイルスの例は、以下のものを含むがこれに限定されない。オルトレオウイルス属 (哺乳類および鳥類レトロウイルス両方の複数の血清型)、オルビウイルス属 (ブルータングウイルス、ユーベナンギー (Eugena nangae) ウィルス、ケメロボウイルス、アフリカウマ疫ウイルス、およびコロラドダニ熱ウイルス)、ロタウイルス属 (ヒトロタウイルス、ネブラスカ仔ウシ下痢症ウイルス、マウスロタウイルス、サルロタウイルス、ウシまたはヒツジロタウイルス、トリロタウイルス) を含むレオウイルス科；エンテロウイルス属 (ポリオウイルス、コクサッキーウイルスAおよびB、ECH

O (enteric cytopathic human orphan) ウイルス、A型肝炎ウイルス、サルエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎 (ME) ウイルス、マウスピリオウイルス (*Poliiovirus muris*)、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス)、カルジオウイルス属 (脳心筋炎ウイルス (EMC)、メンゴウイルス)、ライノウイルス属 (少なくとも 113 のサブタイプを含むヒトライノウイルス；他のライノウイルス)、アフトウイルス属 (口蹄疫 (FMDV)) を含むピコルナウイルス科；ブタ小水疱性発疹ウイルス、サンミグエルアザラシウイルス、ネコピコルナウイルス、およびノーウォークウイルスを含むカリチウイルス科；アルファウイルス属 (東部ウマ脳炎ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルス、チクングニヤウイルス、オニヨンニションウイルス、ロス川ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス)、フラビウイルス (*Flavivirus*) 属 (蚊媒介黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介ウイルス、極東ダニ媒介ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、跳躍病 (*Louping III*) ウィルス、ポーワッサンウイルス、オムスク出血熱ウイルス)、ルビウイルス属 (風疹ウイルス)、ペストウイルス属 (粘膜病ウイルス、ブタコレラウイルス、ボーダー病ウイルス) を含むトガウイルス科；ブンヤウイルス属 (ブニヤンベラおよび関連ウイルス、カリフォルニア脳炎群ウイルス)、フレボウイルス属 (シリアパバタシ熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルス)、ナイロウイルス属 (クリミアーコンゴ出血熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス)、およびウウクウイルス属 (ウウクニエミーおよび関連ウイルス) を含むブンヤウイルス科；インフルエンザウイルス属 (インフルエンザウイルス A型、多くのヒトサブタイプ)、ブタインフルエンザウイルス、およびトリおよびウマインフルエンザウイルス、インフルエンザ B型 (多くのヒトサブタイプ)、およびインフルエンザ C型 (別の属の可能性) を含むオルトミクソウイルス科；バラミクソウイルス属 (パラインフルエンザウイルス 1 型、センダイウイルス、血球吸着ウイルス、パラインフルエンザウイルス 2 から 5 型、ニューカッスル病ウイルス、耳下腺炎ウイルス)、モルビリウイルス属 (麻疹ウイルス、亜急性硬化

性汎脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス)、ニューモウイルス属 (R Sウイルス (R S V)、ウシ R Sウイルス、およびマウス肺炎ウイルス) を含むパラミクソウイルス科; ベシクロウイルス (V S V) 属 (チャンディプラウイルス、フランダースーハートパークウイルス)、狂犬病ウイルス属 (狂犬病ウイルス)、魚類ラブドウイルス、および2つのおそらくはラブドウイルス (マルブルクウイルスおよびエボラウイルス) を含むラブドウイルス科; リンパ性脈絡膜炎ウイルス (L C M) ウィルス、タカリベウイルス複合体、およびラッサウイルスを含むアレナウイルス科; 伝染性気管支炎ウイルス (I B V)、マウス肝炎ウイルス、ヒト腸コロナウイルス、およびネコ伝染性腹膜炎 (ネココロナウイルス) を含むコロナウイルス科のメンバー。

#### 【0070】

脊椎動物において抗原となる、例示的なDNAウイルスは、以下のものを含むがこれに限定されない: オルトポックスウイルス属 (大痘瘡、小痘瘡、サル痘、ワクシニア、牛痘、スイギュウポックス、家兎痘、エクトロメリア)、レポリポックスウイルス属 (粘液腫、纖維腫)、アビポックスウイルス属 (鶏痘、他のトリポックスウイルス)、カプリポックスウイルス属 (羊痘、ヤギ痘)、スイポックスウイルス属 (豚痘)、パラポックスウイルス属 (伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス (*contagious postular dermatitis virus*)、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス) を含むポックスウイルス科; イリドウイルス科 (アフリカブタ熱ウイルス、カエルウイルス2および3、魚類リンパ嚢腫ウイルス); アルファヘルペスウイルス属 (単純ヘルペス1および2型、水痘帶状疱疹、ウマ流産ウイルス、ウマヘルペスウイルス2および3、偽狂犬病ウイルス、伝染性ウシ角結膜炎ウイルス、伝染性ウシ鼻気管炎ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス)、ベータヘルペスウイルス (ヒトサイトメガロウイルスおよびブタ、サル、およびげっ歯類のサイトメガロウイルス); ガンマヘルペスウイルス (エプスタインバーウイルス (E B V)、マレック病ウイルス、リスザルヘルペス、クモザルヘルペスウイルス、ノウサギヘルペスウイルス、モルモットヘルペスウイルス、リュッケ癌ウイルス) を含むヘルペスウイルス科; マストアデノウイルス属 (ヒトサブグループA、B、C、D、E

およびグループ化されていないもの、サルアデノウイルス（少なくとも23の血清型）、伝染性イヌ肝炎、およびウシ、ブタ、ヒツジ、カエル、および多くの他の種のアデノウイルス）、アビアデノウイルス属（トリアデノウイルス）；および培養できないアデノウイルスを含むアデノウイルス科；パピローマウイルス属（ヒトパピローマウイルス、ウシパピローマウイルス、ショープウサギパピローマウイルス、および他の種の様々な病原性パピローマウイルス）、ポリオーマウイルス属（ポリオーマウイルス、サル空胞形成因子（S V - 4 0）、ウサギ空胞形成因子（R K V）、Kウイルス、B Kウイルス、J Cウイルス、およびリンパ増殖性パピローマウイルスのような他の靈長類ポリオーマウイルス）を含むパボーバウイルス科；アデノ随伴ウイルス属、パルボウイルス属（ネコ汎白血球減少症ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、アリューシャンミンク病ウイルスなど）を含むパルボウイルス科。最後に、DNAウイルスは、クールーおよびクロイツフェルトヤコブ病ウイルスおよび慢性伝染性神経障害因子（C H I N Aウイルス）のような、上記の科にあてはまらないウイルスを含み得る。

#### 【0071】

前述のリストのそれぞれは例示であり、そして制限を意図しない。

#### 【0072】

ヒトにおける抗原特異的免疫応答を誘導するためにSキラルC p Gオリゴヌクレオチドを使用することに加えて、好ましい実施態様の方法は、雌鶏、鶏、七面鳥、カモ、ガチョウ、ウズラ、およびキジのようなトリの処置に特によく適している。トリは多くの型の感染に関して主要な標的である。

#### 【0073】

孵化したトリは、誕生直後に病原性の微生物に曝される。これらのトリは最初母親由来の抗体によって病原体から守られるが、この保護は単に一時的であり、そしてそのトリ自身の未成熟な免疫系が、トリを病原体から守り始めなければならない。最も影響されやすい時に、若いトリにおける感染を防止することが、しばしば望ましい。特にトリが、疾患の迅速な蔓延を引き起こす、閉ざされた宿舎に収容されている場合、年長のトリにおいて感染を防止することもまた望ましい。従って、抗原が存在する場合、本発明のC p Gオリゴヌクレオチドおよび非核

酸アジュバントをトリに投与して、抗原特異的免疫反応を増強することが望ましい。

#### 【0074】

鶏におけるよくある感染の例は、鶏伝染性貧血ウイルス（CIAV）である。CIAVは、マレク病予防接種の中止（break）の調査中に、1979年に日本で最初に単離された（Yuasaら、1979、Avian Dis. 23: 366-385）。その時以来、CIAVは全ての主要な鶏肉産生国において、市販の鶏肉で検出された（van Bulowら、1991、pp 690-699、Disease of Poultry、第9版、Iowa State University Press）。

#### 【0075】

CIAV感染は、若い感受性の鶏において、貧血、出血、および免疫抑制によって特徴付けられる臨床疾患を引き起こす。CIAV感染鶏の胸腺および骨髄の萎縮、および一致した損傷もまた、CIAV感染の特徴である。胸腺、および時折はファブリーキウス嚢におけるリンパ球の渇渴は、免疫抑制を引き起こし、そして2次的なウイルス、細菌、または真菌感染に対する感受性を増し、それは次いで疾患の経過を悪化させる。免疫抑制は、1つ以上のマレク病ウイルス（MDV）、伝染性ブルザ病（bursal disease）ウイルス、細網内皮症ウイルス、アデノウイルス、またはレオウイルスの感染後に、疾患を悪化させ得る。MDVの病原性は、CIAVによって増強されることが報告された（De Boerら、1989、p. 28、Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference、Tempe、Ariz.）。さらに、CIAVは、伝染性ブルザ病の徵候を悪化させることが報告された（Rosenbergerら、1989、Avian Dis. 33: 707-713）。鶏は、CAAによって実験的に誘導された疾患に対して年齢抵抗性を発達させる。これは本質的には2週齢までに完了するが、年長のトリもなお感染に感受性である（Yuasa, N. ら、1979、前出；Yuasa, N. ら、Avian Diseases 24, 202-209、1980）。しかし、もし鶏がCAAおよび免疫抑制因子（IBDV、

MDVなど)で二重に感染すると、疾患に対する年齢抵抗性は遅延する (Yusa, N. ら、1979および1980、前出; Bulow von V. ら、J. Veterinary Medicine 33, 93-116, 1986)。疾患の伝染を増強し得るCIAVの特徴は、環境的不活性化およびいくつかのよくある消毒薬に対する高い抵抗性を含む。鶏肉産業に対するCIAV感染の経済的影响は、疾患の大発生において感染したトリの10%~30%が死亡するという事実から明らかである。

#### 【0076】

トリの予防接種は、他の脊椎動物と同様に、あらゆる年齢で実施され得る。通常、予防接種は、生微生物に関しては12週齢までに、不活性化微生物または他の型のワクチンに関しては14-18週の間に実施される。卵における (in ovo) 予防接種に関しては、予防接種は、胚発達の最後の4分の1に実施され得る。ワクチンは皮下に、スプレーによって、経口で、眼球内に、気管内に、鼻腔内に、または本明細書中で記載される他の粘膜伝達方法によって投与され得る。従って、本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、慣用的な予防接種スケジュールを用いて、トリおよび他の非ヒト脊椎動物に投与され得、そして抗原は、本明細書中で記載されるように、適切な時間の後投与される。

#### 【0077】

ウシおよび家畜もまた感染に感受性である。これらの動物に影響を与える疾患は、特にウシにおいて重大な経済的損失を產生し得る。本発明の方法は、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、およびヤギのような家畜において、感染から保護するために使用され得る。

#### 【0078】

ウシはウシウイルスによって感染され得る。ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、小さな、エンベロープに包まれた+鎖RNAウイルスであり、そしてブタコレラウイルス (HOCV) およびヒツジボーダー病ウイルス (BDV) と共にペストウイルス属に分類される。ペストウイルスは以前トガウイルス科に分類されていたが、いくつかの研究が、ラビウイルスおよびC型肝炎ウイルス (HCV) グループと共に、そのラビウイルス科への再分類を示唆した (Fr

a n c k i l a , 1 9 9 1 ) 。

#### 【0079】

ウシにおいて重要な病原体であるBVDVは、細胞培養分析に基づいて、細胞病原性(CP)および非細胞病原性(NCP)生物型に区別され得る。NCP生物型がより広まっているが、両方の生物型をウシにおいて見出し得る。妊娠ウシがNCP系統に感染した場合、そのウシは、持続的に感染し、そしてその生涯の間にウイルスを広める、特異的に免疫寛容の仔ウシを出産し得る。持続感染したウシは、粘膜疾患に屈服し得、次いで両方の生物型がその動物から単離され得る。臨床的な徴候としては、流産、奇形発生、および呼吸器の問題、粘膜疾患および軽症の下痢が挙げられ得る。さらに、群れの流行と関連した、動物の死を引き起こし得る重症の血小板減少症が記載され、そしてこの疾患と関連する系統は、古典的なBVDVよりも悪性であるようである。

#### 【0080】

ウマヘルペスウイルス(EHV)は、無症状から致死的疾患にわたる、ウマにおける種々の感染を引き起こす、抗原的に区別される生物学的因素のグループを含む。これらはウマヘルペスウイルス-1(EHV-1)、ウマにおける遍在的な病原体を含む。EHV-1は、流産、気道疾患、および中枢神経系の障害の流行に関連する。若いウマにおける上部気道の最初の感染が、8~10日間続く熱性の疾患を引き起こす。免疫学的に経験した雌馬は、疾患が明らかになると上部気道によって再感染し得るので、流産は、通常前兆無しに起こる。神経学的な症候群は、呼吸器疾患または流産と関連しており、そしてあらゆる年齢でどちらの性別の動物にも影響し得、協調不能、衰弱、および後部麻痺に至る(Telford, E. A. R. ら, Virology 189, 304-316, 1992)。他のEHVは、EHV-2、またはウマサイトメガロウイルス、EHV-3、ウマ交疹ウイルス、および以前はEHV-1サブタイプ2と分類されていたEHV-4を含む。

#### 【0081】

ヒツジおよびヤギは、ビスナーマエディを含む種々の危険な微生物に感染し得る。

## 【0082】

サル、類人猿、およびマカクザルのような霊長類は、サル免疫不全ウイルスに感染し得る。不活性化細胞ウイルスおよび細胞を含まない全サル免疫不全ワクチンが、マカクザルにおいて保護を提供することが報告された (Stottら (1990) *Lancet* 36:1538-1541; Destrosiersら、PNAS USA (1989) 86:6353-6357; Murphrey-Corbら (1989) *Science* 246:1293-1297; および Carlsonら (1990) AIDS Res. Human Retroviruses 6:1239-1246)。組換えHIV gp 120ワクチンが、チンパンジーにおいて保護を提供することが報告された (Bermannら (1990) *Nature* 345:622-625)。

## 【0083】

飼育されている、および野生のネコはどちらも、種々の微生物の感染に感受性である。例えば、ネコ伝染性腹膜炎は、ライオン、ヒョウ、チーター、およびジャガーのような飼育または野生ネコのどちらにおいても起こる疾患である。ネコにおけるこの型または他の型の病原性生物による感染を防止するのが望ましい場合、本発明の方法が、感染から守るためにネコに予防接種するために使用され得る。

## 【0084】

飼育ネコは、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、ネコ肉腫ウイルス (FesV)、内因性C型オンコルナウイルス (RD-114)、およびネコシンシチア形成ウイルス (FesFV) を含むがこれに限定されないいくつかのレトロウイルスに感染し得る。これらのうち、FeLVがリンパ網内性および骨髄性の新生物、貧血、免疫による疾患、およびヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) に似た免疫不全症候群を含む多様な症状を引き起こす最も重要な病原体である。最近、FeLV-AIDSと呼ばれる特定の複製欠損FeLV変異体が、より特異的に免疫抑制性質と関連していた。

## 【0085】

ネコTリンパ指向性レンチウイルス (ネコ免疫不全とも呼ばれる) の発見は、

Pedersenら(1987) Science 235: 790-793において最初に報告された。FIVの特徴は、Yamamotoら(1988) Leukemia, December Supplement 2: 204S-215S; Yamamotoら(1988) Am. J. Vet. Res. 49: 1246-1258; およびAckleyら(1990) J. Virol. 64: 5652-5655で報告された。FIVのクローニングおよび配列分析は、Olmstedら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2448-2452および86: 4355-4360で報告された。

#### 【0086】

ネコ伝染性腹膜炎(FIP)は、飼育および野生のネコ科動物において予測不能に起こる散発性の疾患である。FIPは主には飼育ネコの疾患であるが、ライオン、クーガー、ヒョウ、チーター、およびジャガーで診断された。FIPに罹患した小型野生ネコは、リンクスおよびカラカル、サンドキャット(sand cat)、およびパラスキヤット(pallas cat)を含む。飼育ネコにおいて、全ての年齢のネコが感受性であるが、その疾患は大部分若い動物において起こる。発症のピークは、6~12月齢の間に起こる。5~13年齢で発症の減少が見られ、続いて14~15歳のネコで発生が増加する。

#### 【0087】

魚、貝、または他の水生生命形態におけるウイルス、細菌、および寄生生物性の疾患は、水産養殖産業で深刻な問題を提起する。孵化タンクにおける動物の高密度、または閉ざされた海洋養殖領域のために、伝染性疾患は、例えば魚、貝、または他の水生生命形態の施設において飼育用動物の多くの割合を根絶し得る。一旦疾患が進行してからの介入よりも、疾患の予防が、この魚への脅威に対するより望ましい治療である。魚の予防接種は、免疫を介した長期間の保護を付与し得る唯一の予防的方法である。核酸に基づくワクチン接種が、Davisに発行された米国特許第5,780,448号で記載されている。

#### 【0088】

魚の免疫系は、B細胞、T細胞、リンホカイン、補体、および免疫グロブリンの存在のような、哺乳動物免疫系と似た多くの特徴を有している。魚は多くの点

で哺乳動物のBおよびT細胞のものと似ているようである役割を有するリンパ球のサブクラスを有している。ワクチンは、浸漬または経口によって投与され得る。

### 【0089】

水産養殖種は、魚、貝、および他の水生動物を含むがこれに限定されない。魚は、全ての脊椎のある魚を含む。それは、例えば、サケ科の魚、コイ、ナマズ、ブリ、タイ、およびスズキのような硬骨魚または軟骨魚であり得る。サケ科は魚の1つの科であり、マス（ニジマスを含む）、サケ、および北極のイワナ（Arctic char）を含む。貝の例は、クラム、ロブスター、エビ、カニ、およびカキを含むがこれに限定されない。他の養殖水生動物は、ウナギ、イカ、およびタコを含むがこれに限定されない。

### 【0090】

ウイルス性水産養殖病原体のポリペプチドは、ウイルス性出血性敗血症ウイルス（VHSV）の糖タンパク質（G）または核タンパク質（N）；伝染性造血性壞死ウイルス（IHNV）のGまたはNタンパク質；伝染性脾臓壞死ウイルス（IPNV）のVP1、VP2、VP3、またはN構造タンパク質；コイ春ウイルス血症（SVC）のGタンパク質；およびブチナマズウイルス（CCV）の膜関連タンパク質、テグミン（tegumin）もしくはキャプシドタンパク質または糖タンパク質を含むがこれに限定されない。

### 【0091】

細菌性病原体のポリペプチドは、フルンケル症を引き起こすAeromonas salmonicidaの鉄調節外膜タンパク質（IROMP）、外膜タンパク質（OMP）、およびAタンパク質、細菌性腎臓疾患（BKD）を引き起こすRenibacterium salmoninarumのp57タンパク質、エルジニア症の主要表面関連抗原（msa）、表面発現サイトトキシン（mpn）、表面発現溶血素（ish）、および鞭毛抗原；パストレラ症の細胞外タンパク質（ECP）、鉄調節外膜タンパク質（IROMP）、および構造タンパク質；Vibrios anguillarumおよびV. ordaliiのOMPおよび鞭毛タンパク質；Edwardsiella ictalur

i および E. tarda の鞭毛タンパク質、OMPタンパク質、aroA、および purA；および Ichthyophthirius の表面抗原；および Cytophaga columnari の構造タンパク質および調節タンパク質；およびリケッチアの構造タンパク質および調節タンパク質を含むがこれに限定されない。

### 【0092】

寄生生物性の病原体のポリペプチドは、Ichthyophthirius の表面抗原を含むがこれに限定されない。

### 【0093】

「アレルゲン」は、感受性の被験体でアレルギー性または喘息応答を誘導し得る物質（抗原）をいう。アレルゲンのリストは膨大であり、そして花粉、昆虫の毒液、動物の鱗屑、真菌の胞子および薬物（例えばペニシリン）を含み得る。天然の、動物および植物アレルゲンの例は以下の属に特異的なタンパク質を含むがこれに限定されない：Canine (Canis familiaris) ; Dermatophagoïdes (例えばDermatophagoïdes farinæ) ; Felis (Felis domesticus) ; Ambrosia (Ambrosia artemisiifolia) ; Lolium (例えばLolium perenneまたはLolium multiflorum) ; Cryptomeria (Cryptomeria japonica) ; Alternaria (Alternaria alternata) ; Alder ; Alnus (Alnus glutinosa) ; Betula (Betula verrucosa) ; Quercus (Quercus alba) ; Olea (Olea europaea) ; Artemisia (Artemisia vulgaris) ; Plantago (例えばPlantago lanceolata) ; Parietaria (例えばParietaria officinalisまたはParietaria judaica) ; Blattella (例えばBlattella germanica) ; Apis (例えばApis mellifera) ; Cupressus (例えばCupressus sempervirens, Cupressus a

*rizonica*、および*Cupressus macrocarpa*) ; *Juniperus* (例えば*Juniperus sabinaoides*、*Juniperus virginiana*、*Juniperus communis*、および*Juniperus ashei*) ; *Thuya* (例えば*Thuya orientalis*) ; *Chamaecyparis* (例えば*Chamaecyparis obtusa*) ; *Periplaneta* (例えば*Periplaneta americana*) ; *Agropyron* (例えば*Agropyron repens*) ; *Secale* (例えば*Secale cereale*) ; *Triticum* (例えば*Triticum aestivum*) ; *Dactylis* (例えば*Dactylis glomerata*) ; *Festuca* (例えば*Festuca elatior*) ; *Poa* (例えば*Poa pratensis*または*Poa compressa*) ; *Avena* (例えば*Avena sativa*) ; *Holcus* (例えば*Holcus lanatus*) ; *Anthoxanthum* (例えば*Anthoxanthum odoratum*) ; *Arrhenatherum* (例えば*Arrhenatherum elatius*) ; *Agrostis* (例えば*Agrostis alba*) ; *Phleum* (例えば*Phleum pratense*) ; *Phalaris* (例えば*Phalaris arundinacea*) ; *Paspalum* (例えば*Paspalum notatum*) ; *Sorghum* (例えば*Sorghum halepensis*) ; および *Bromus* (例えば*Bromus inermis*)。

#### 【0094】

抗原は、核酸ベクターにコードされた抗原であってもよいし、または抗原は核酸ベクターにコードされなくともよい。前者の場合、核酸ベクターは被験体に投与され、そしてインビボで抗原が発現する。後者の場合、抗原は被験体に直接投与され得る。「核酸ベクターにコードされない抗原」は、本明細書中で使用される場合、核酸ではない任意の型の抗原をいう。例えば、本発明のいくつかの局面では、核酸ベクターにコードされない抗原はポリペプチドである。ポリペプチド抗原の一次アミノ酸配列に対する重要でない修飾も、未修飾の対応するポリペプ

チドと比べて実質的に等価な抗原活性を有するポリペプチドとなり得る。そのような修飾は、部位特異的変異誘発によるように意図的、または自然発生的であり得る。これらの修飾によって產生される全てのポリペプチドは、抗原性が依然として存在する限り、この中に含まれる。ポリペプチドは、例えば、ウイルスポリペプチドであり得る。

#### 【0095】

「実質的に精製された」という用語は、本明細書中で使用される場合、天然で会合している他のタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質を実質的に含まないポリペプチドをいう。当業者は、タンパク質精製の標準的な技術を用いて、ウイルスまたは細菌のポリペプチドを精製し得る。実質的に純粋なポリペプチドはしばしば、非還元ポリアクリルアミドゲルで单一の主要なバンドを生じる。部分的にグリコシル化されたポリペプチド、またはいくつかの開始コドンを有するポリペプチドの場合、非還元ポリアクリルアミドゲルでいくつかのバンドが存在し得るが、これらは、そのポリペプチドについて特有のパターンを形成する。ウイルスまたは細菌のポリペプチドの純度はまた、アミノ末端アミノ酸配列分析によって決定され得る。ポリサッカライド、低分子、模倣物などのような、核酸ベクターによってコードされない他の型の抗原は、上記で記載される。

#### 【0096】

本発明はまた、抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用する。抗原が、抗原をコードする核酸分子において被験体に送達され得、その結果、抗原がインビボで発現されなければならないと考えられる。核酸ベクターにおいて被験体に送達されるそのような抗原は、「核酸ベクターによってコードされる抗原」と呼ばれる。抗原をコードする核酸は、真核生物細胞内での抗原核酸の発現を指示する遺伝子発現配列に作動可能に連結される。「遺伝子発現配列」は、それに作動可能に連結される抗原核酸の効率的な転写および翻訳を促進する、プロモーター配列またはプロモーター-エンハンサーの組み合せのような、任意の調節性ヌクレオチド配列である。遺伝子発現配列は、例えば構成的または誘導性プロモーターのような、哺乳動物またはウイルスのプロモーターであり得る。構成的哺乳動物プロモーターとしては、以下の遺伝子のプロモーターおよび他の構

成的プロモーターが挙げられるがこれに限定されない：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H P T R）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、 $\beta$ -アクチンプロモーター。真核生物細胞において構成的に機能する例示的なウイルスプロモーターとしては、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス（例えば、S V 4 0）、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ラウス肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス由来のプロモーター、モロニー白血病ウイルスおよび他のレトロウイルスの長末端反復（L T R）、ならびに単純疱疹ウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが挙げられる。他の構成的プロモーターは、当業者に公知である。本発明の遺伝子発現配列として有用なプロモーターはまた、誘導性プロモーターを含む。誘導性プロモーターは、誘導剤の存在下で発現する。例えば、メタロチオネインプロモーターは、特定の金属イオンの存在下で誘導されて、転写および翻訳を促進する。他の誘導性プロモーターは、当業者に公知である。

#### 【0097】

一般的に、遺伝子発現配列は、必要に応じて、T A T A ボックス、キャッピング配列、C A A T 配列などのような、それぞれ転写および翻訳の開始に関わる、5' 非転写配列および5' 非翻訳配列を含む。特にそのような5' 非転写配列は、作動可能に連結された抗原核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。遺伝子発現配列は、所望の場合、必要に応じてエンハンサー配列または上流のアクチベーター配列を含む。

#### 【0098】

抗原核酸は、遺伝子発現配列に作動可能に連結される。本明細書中で使用される場合、抗原核酸配列および遺伝子発現配列は、それらが抗原をコードする配列の発現または転写および／または翻訳を、遺伝子発現配列の影響または制御下に置くような様式で共有結合している場合、「作動可能に連結している」といわれる。2つのD N A配列は、5' 遺伝子発現配列のプロモーターの誘導が抗原配列の転写を引き起こす場合、および2つのD N A配列間の結合の性質が（1）フレームシフト変異の導入を引き起こさず、（2）プロモーター領域が抗原配列の転写を指示する能力を妨害せず、（3）対応するR N A転写物がタンパク質へと翻

訳される能力を妨害もしない場合、作動可能に連結しているといわれる。従って、遺伝子発現配列がその抗原核酸配列の転写をもたらすことができ、その結果、得られる転写物が望ましいタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるなら、遺伝子発現配列は抗原核酸配列に作動可能に連結されている。

#### 【0099】

本発明の抗原核酸は、免疫系に単独でまたはベクターと共に送達され得る。最も広い意味では、「ベクター」は、抗原が免疫細胞の表面に発現および提示され得るように、抗原核酸の免疫系細胞への移入を促進することができる任意のビヒクルである。ベクターは一般的に、ベクターの非存在下で起こる分解の程度に比べて分解が減少して、核酸を免疫細胞に輸送する。ベクターは、免疫細胞中での抗原核酸の発現を増強するために、必要に応じて上記の遺伝子発現配列を含む。一般的に、本発明で有用なベクターとしては、抗原核酸配列の挿入または組込みによって操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス供給源または細菌供給源由来の他のビヒクルが挙げられるがこれらに限定されない。ウイルスベクターは、好ましい型のベクターであり、そしてウイルスベクターとしては以下のウイルス由来の核酸配列が挙げられるがこれらに限定されない：モロニーマウス白血病ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳腺癌ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルス；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；SV-40型のウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタインバーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；およびレトロウイルスのようなRNAウイルス。示されていないが当該分野で公知の他のベクターを容易に用い得る。

#### 【0100】

好ましいウイルスベクターは、本質的でない遺伝子が目的の遺伝子で置換された非細胞変性真核ウイルスに基づく。非細胞変性ウイルスは、レトロウイルスを含み、その生活環はゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写、続く宿主細胞DNAへのプロウイルスの組込みを含む。レトロウイルスは、ヒト遺伝子治療試験のために認可された。最も有用なものは、複製欠損レトロウイルスである（すなわち、望ましいタンパク質の合成を指示できるが、感染性粒子を作ることができ

ない）。そのような遺伝的に変化したレトロウイルス発現ベクターは、インビオでの高い効率の遺伝子形質導入のために一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを产生するための標準的なプロトコール（外来性の遺伝物質のプラスミドへの組込み、プラスミドでのパッケージング細胞株のトランスフェクション、パッケージング細胞株による組換えレトロウイルスの產生、組織培養培地からのウイルス粒子の収集、およびウイルス粒子による標的細胞の感染の工程を含む）が、Kriegler, M.、「Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual」W. H. Freeman C. O., New York (1990) およびMurry, E. J. 「Methods in Molecular Biology」、7巻、Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) で提供される。

#### 【0101】

ある適用に好ましいウイルスは、アデノ随伴ウイルス、2本鎖DNAウイルスである。アデノ随伴ウイルスは、複製欠損になるように操作され得、そして広い範囲の細胞型および種に感染することができる。それはさらに、熱および脂質溶媒安定性；造血細胞を含む多様な系統の細胞における高い形質導入頻度；および重感染阻害を欠き、従って複数の一連の形質導入を可能にするというような利点を有する。伝える所によれば、アデノ随伴ウイルスは、部位特異的な様式でヒト細胞DNAに組み込まれ得、それによって、レトロウイルスの感染に特徴的な、挿入変異の可能性および挿入された遺伝子発現の変動を最小にする。さらに、野生型アデノ随伴ウイルスの感染は、組織培養において、選択圧の非存在下で100を越える継代にわたって追跡され、このことは、アデノ随伴ウイルスのゲノム組込みは、比較的安定な事象であることを示した。アデノ随伴ウイルスはまた、染色体外の様式でも機能し得る。

#### 【0102】

他のベクターは、プラスミドベクターを含む。プラスミドベクターは、当該分野で大量に記載され、そして当業者に周知である。例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Man

ual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989を参照のこと。過去数年間、プラスミドベクターは、宿主ゲノム内で複製されることも、宿主ゲノムに組み込まれることもできないので、プラスミドベクターは、インビボで遺伝子を細胞に送達するのに特に有利であることが見出された。しかし、宿主細胞と適合性のプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内に作動可能にコードされた遺伝子からペプチドを発現することができる。いくつかの普通に使用されるプラスミドとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40、およびpBlueScriptが挙げられる。他のプラスミドが当業者に周知である。さらに、プラスミドは、制限酵素および連結反応を用いて特定のDNAフラグメントを除去および付加するように注文設計され得る。

#### 【0103】

遺伝子を運ぶプラスミドが細菌を用いて免疫系に送達され得ることが、最近発見された。Salmonellaのような改変された形の細菌が、プラスミドでトランスフェクトされ、そして送達ビヒクルとして使用され得る。細菌性送達ビヒクルは、宿主被験体に経口または他の投与手段によって投与され得る。細菌はプラスミドを、おそらく消化管の閥門を通り抜けることによって、免疫細胞、例えばB細胞、樹状細胞に送達する。高レベルの免疫保護が、この方法論を用いて達成された。そのような送達方法は、抗原、SキラルCpGオリゴヌクレオチド、および／または他の治療剤の全身性送達を利用する、本発明の局面に有用である。

#### 【0104】

SキラルCpGオリゴヌクレオチドは、免疫応答を増強するためにアジュvantのような他の治療剤と組み合わされ得る。CpGオリゴヌクレオチドおよび他の治療剤は、同時にまたは連続的に投与され得る。他の治療剤が同時に投与される場合、それらは同じまたは別の処方で投与され得るが、同時に投与される。他の治療剤の投与とCpGの投与とが時間的に離れている場合、他の治療剤は互いにおよびCpGと共に逐次投与される。これら化合物の投与の間の時間的な隔たりは、約数分以上であり得る。他の治療剤としては、アジュvant、サイトカイ

ン、抗体、抗原などが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0105】

SキラルCpGオリゴヌクレオチドは、全身性免疫応答を誘導するアジュバントとして有用である。従って、それは抗原に曝露された被験体に送達されて、その抗原に対する増強された免疫応答を產生し得る。

#### 【0106】

SキラルCpGオリゴヌクレオチドに加えて、本発明の組成物はまた、非核酸アジュバントと共に投与され得る。「非核酸アジュバント」は、体液性および/または細胞性免疫応答を刺激し得る、本明細書中で記載されたCpGオリゴヌクレオチド以外の任意の分子または化合物である。非核酸アジュバントは、例えばd<sup>e</sup>p<sup>o</sup>効果を引き起こすアジュバント、免疫刺激アジュバント、およびd<sup>e</sup>p<sup>o</sup>効果を引き起こし、そして免疫系を刺激するアジュバントを含む。

#### 【0107】

「d<sup>e</sup>p<sup>o</sup>効果を引き起こすアジュバント」は、本明細書中で使用される場合、抗原が体内でゆっくりと放出され、従って免疫細胞の抗原への曝露を長くするのを引き起こすアジュバントである。このクラスのアジュバントとしては、ミョウバン（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）；またはMontanideアジュバントのSeppic ISAシリーズ（例えば、Montanide ISA 720、Air Liquide、Paris、France）；MF-59（Span 85およびTween 80で安定化した水中スクアレンエマルジョン；Chiron Corporation、Emeryville、CA）；およびPROVAX（安定剤およびミセル形成剤を含む水中油型エマルジョン；IDEC Pharmaceuticals Corporation、San Diego、CA）のような、鉱油、非鉱油、油中水型または油中水中油型エマルジョン、水中油型エマルジョンを含む、エマルジョンに基づく処方物が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0108】

「免疫刺激アジュバント」は、免疫系細胞の活性化を引き起こすアジュバントである。例えば、それは免疫細胞にサイトカインを產生および分泌させ得る。こ

のクラスのアジュバントとしては、QS21（HPLC分画で21番目のピークに溶出される糖脂質；Aquila Biopharmaceuticals, Inc.、Worcester、MA）のような、*Q. saponaria*の木の樹皮から精製されたサポニン；ポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン（poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]（PCPPポリマー；Virus Research Institute、USA）；モノホスホリルリピドA（MPL；Ribis ImmunoChem Research, Inc.、Hamilton、MT）、ムラミルジペプチド（MDP；Ribis）およびスレオニルムラミルジペプチド（t-MDP；Ribis）のような、リポポリサッカライドの誘導体；OM-174（リピドAに関連するグルコサミンジサッカライド；OM Pharma SA、Meyrin、Switzerland）；およびLeishmania伸長因子（精製Leishmaniaタンパク質；Corixa Corporation、Seattle、WA）が挙げられるがこれらに限定されない。

### 【0109】

「depo効果を引き起こし、そして免疫系を刺激するアジュバント」は、上記で同定した機能を両方有する化合物である。このクラスのアジュバントとしては、ISCOMS（混合サポニン、脂質を含む免疫刺激複合体であり、そして抗原を保持し得る孔を有するウイルスの大きさの粒子を形成する；CSL、Melbourne、Australia）；SB-AS2（MPLおよびQS21を含む水中油型エマルジョンであるSmithKline Beechamアジュバントシステム#2；SmithKline Beecham Biologicals [SBB]、Rixensart、Belgium）；SB-AS4（ミョウバンおよびMPLを含むSmithKline Beechamアジュバントシステム#4；SBB、Belgium）；CRL 1005（これらは、ポリオキシエチレン鎖に隣接した疎水性ポリオキシプロピレン（polyoxpropylene）の直鎖を含む；Vaxcel, Inc.、Norcross、GA）のようなミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー；およびSyntex Adjuvant Formulation (SAF、Teween

80および非イオン性ブロックコポリマーを含む水中油型エマルジョン；Syntex Chemicals, Inc.、Boulder, CO) が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0110】

SキラルCpGオリゴヌクレオチドはまた、粘膜アジュバントとして有用である。全身性免疫および粘膜免疫は両方ともCpGオリゴヌクレオチドの粘膜送達によって誘導されることが、以前発見された。CpGオリゴヌクレオチドに応じて誘導される全身性免疫は、単独で粘膜に投与された場合に全身性免疫を誘導できなかった特定の抗原に対する体液性応答および細胞性応答の両方を含んでいた。さらに、CpGオリゴヌクレオチドおよびコレラ毒素(CT、Th2様応答を誘導する粘膜アジュバント)は両方ともCTLを誘導した。全身性免疫に関しては、Th2様抗体の存在は通常CTLの欠如と関連するので、これは驚くべきことであった(Schirmbbeckら、1995)。

#### 【0111】

さらに、CpGオリゴヌクレオチドは、局所粘膜部位(例えば、肺)および離れた粘膜部位(例えば、下部消化管)の両方において粘膜応答を誘導することが見出された。CpGオリゴヌクレオチドは、全身抗体(IgG)および局所粘膜抗体(IgA)の誘導に関してCTと同様であったが、有意なレベルのIgA抗体が、CpGオリゴヌクレオチドによってのみ離れた粘膜部位で誘導され、そしてCTでは誘導されなかった。CTは一般的に非常に有効な粘膜アジュバントであると判断されるので、これは驚くべきことであった。CpGオリゴヌクレオチドがCTに優る別の方法は、応答のTh型に関するものであった。以前に報告されたように(Snider 1995)、CTは主に、Th2型の応答を示す、抗体のIgG1アイソタイプを誘導する。対照的に、CpGオリゴヌクレオチドは、特に追加免疫後、または2つのアジュバントを組み合わせた場合、主にIgG2a抗体を伴う、よりTh1であった。一般的に、Th1型抗体は、より良い中和能力を有し、そしてさらに、肺におけるTh2応答は、喘息と関連するので非常に望ましくない(Kay、1996、Hogg、1997)。従って、粘膜アジュバントとしてCpGオリゴヌクレオチドを使用することは、他の粘膜アジ

ュバントが達成できない利点を有する。本発明のSキラルCpGオリゴヌクレオチドは、全身性免疫応答および粘膜免疫応答の両方を誘導するための粘膜アジュバントとして有用である。

### 【0112】

非オリゴヌクレオチド粘膜アジュバントと呼ばれる粘膜アジュバントも、SキラルCpGオリゴヌクレオチドと共に投与され得る。「非オリゴヌクレオチド粘膜アジュバント」は、本明細書中で使用される場合、粘膜表面に抗原と共に投与された場合に被験体において粘膜免疫応答を誘導できる、SキラルCpGオリゴヌクレオチド以外のアジュバントである。粘膜アジュバントとしては、細菌毒素：例えばコレラ毒素（CT）、CT-Bサブユニット（CTB）（Wular、1998、Tochikuboら、1998）；CTD53（ValからAsp）（Fontanaral、1995）；CTK97（ValからLys）（Fontanaral、1995）；CTK104（TyrからLys）（Fontanaral、1995）；CTD53/K63（ValからAsp、SerからLys）（Fontanaral、1995）；CTH54（ArgからHis）（Fontanaral、1995）；CTN107（HisからAsn）（Fontanaral、1995）；CTE114（SerからGlu）（Fontanaral、1995）；CTE112K（GluからLys）（Yamamotoら、1997a）；CTS61F（SerからPhe）（Yamamotoら、1997a、1997b）；CTS106（ProからLys）（Douceら、1997、Fontanaral、1995）；およびCTK63（SerからLys）（Douceら、1997、Fontanaral、1995）を含むがこれらに限定されないCT誘導体、閉鎖帶毒素zot、Escherichia coli熱不安定エンテロトキシン、不安定毒素（LT）、LT-Bサブユニット（LTB）（Verweijら、1998）；LT7K（ArgからLys）（Komaseら、1998、Douceら、1995）；LT61F（SerからPhe）（Komaseら、1998）；LT112K（GluからLys）（Komaseら、1998）；LT118E（GlyからGlu）（Komaseら、1998）；LT146E（ArgからGlu）（Komaseら、1998）；LT19

2G (ArgからGly) (Komaseら、1998) ; LTK63 (SerからLys) (Marchettিら、1998, Douceら、1997, 1998, Di Tommasoら、1996) ; およびLTR72 (Alaから, Arg) (Giulianiら、1998) を含むがこれらに限定されないLT誘導体、PT-9K/129G (Robertsら、1995, Cropleyら、1995) を含む百日咳毒素PT (Lyckeら、1992, Spangler BD、1992, FreytagおよびClemments、1999, Robertsら、1995, Wilsonら、1995) ; 毒素誘導体(下記参照) (Holmgrenら、1993, Verweijら、1998, Rappuoliら、1995, FreytagおよびClemments、1999) ; リピドA誘導体(例えば、モノホスホリルリピドA、MPL) (Sasakiら、1998, Vancottら、1998) ; ムラミルジペプチド(MDP)誘導体(Fukushimaら、1996, Ogawaら、1989, Michalekら、1983, Morisakiら、1983) ; 細菌外膜タンパク質(例えば、Borrelia burgdorferiの外表面タンパク質A(OspA)リポタンパク質、Neisseria meningitidisの外膜タンパク質) (Marinaroら、1999, Van de Vergら、1996) ; 水中油型エマルジョン(例えば、MF59) (Barchfieldら、1999, Verschoorら、1999, O'Hagan、1998) ; アルミニウム塩(Isakaら、1998、1999) ; およびサポニン(例えば、QS21; Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, MA) (Sasakiら、1998, MacNealら、1998) ; ISCOMS, MF-59 (Span 85およびTween 80で安定化された水中スクアレンエマルジョン; Chiron Corporation, Emeryville, CA) ; MontanideアジュvantのSeppic ISAシリーズ(例えば、Montanide ISA720; Air Liquide, Paris, France) ; PROVAX(安定化洗剤およびミセル形成剤を含む水中油型エマルジョン; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, C

A) ; Syntex Adjuvant Formulation (SAF; Syntex Chemicals, Inc.、Boulder, CO) ; ポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン(PCPPポリマー、Viruses Research Institute, USA) およびLeishmania伸長因子(Corixa Corporation, Seattle, WA)が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0113】

免疫応答はまた、サイトカイン(BuelerおよびMulligan, 1996; Chowら、1997; Geisslerら、1997; Iwasakiら、1997; Kimら、1997)またはB-7補助的刺激分子(Iwasakiら、1997; Tsujiiら、1997)とキラルCpGオリゴヌクレオチドとの同時投与または同一線上の(co-linear)発現によって誘導または増強され得る。サイトカインは、CpGオリゴヌクレオチドと共に直接投与され得るか、またはサイトカインがインビボで発現し得るように、サイトカインをコードする核酸ベクターの形態で投与され得る。1つの実施態様では、サイトカインはプラスミド発現ベクターの形態で投与される。「サイトカイン」という用語は、ナノからピコモル濃度の濃度で体液性レギュレーターとして作用し、そして正常な状態または病的状態のいずれかにおいて個々の細胞および組織の機能的活性を調節する、多様なグループの可溶性のタンパク質およびペプチドの一般名として使用される。これらのタンパク質はまた、直接細胞間の相互作用を媒介し、そして細胞外環境で起こるプロセスを調節する。サイトカインの例としては、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)、インターフェロン- $\gamma$ ( $\gamma$ -IFN)、IFN- $\alpha$ 、腫瘍壞死因子(TNF)、TGF- $\beta$ 、FLT-3リガンドおよびCD40リガンドが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0114】

サイトカインは、T細胞応答の指示において役割を果たしている。ヘルパー(CD4+)T細胞は、他のT細胞を含む他の免疫系細胞に対して作用する可溶性

因子の産生を通して、哺乳動物の免疫応答を組み合わせる。最も成熟したCD4+Tヘルパー細胞は、Th1またはTh2の、2つのサイトカインプロファイルの1つを発現する。Th1細胞は、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、GM-CSF、および低レベルのTNF- $\alpha$ を発現する。TH1サブセットは、遅延型過敏症、細胞媒介性免疫、およびIgG<sub>2a</sub>への免疫グロブリンのクラススイッチを促進する。Th2サブセットは、B細胞の活性化、抗体産生の促進、およびIgG<sub>1</sub>からIgEへのクラススイッチ誘導によって、体液性免疫を誘導する。いくつかの実施態様では、サイトカインはTh1サイトカインであることが好ましい。

#### 【0115】

Sキラルオリゴヌクレオチドはまた、Th2免疫応答からTh1免疫応答へと、免疫応答を向かなおすのにも有用である。Th2免疫応答からTh1免疫応答への免疫応答の向かなおしは、オリゴヌクレオチドに応じて產生されるサイトカインレベルを測定することによって（例えば、単球細胞および他の細胞を、IL-12、IFN- $\gamma$ 、およびGM-CSFを含むTh1サイトカインを产生するように誘導することによって）評価され得る。Th2応答からTh1応答への免疫応答の向かなおしは、喘息の治療または予防に特に有用である。例えば、喘息の治療に「有効な量」は、喘息に関連するTh2型免疫応答を、Th1型の応答へと向かなおすのに有用な量であり得る。Th2サイトカイン、特にIL-4およびIL-5は、喘息被験体の気道で上昇している。これらのサイトカインは、IgEアイソタイプのスイッチ、好酸球の走化性および活性化、ならびに肥満細胞の増殖を含む、喘息の炎症性応答の重要な局面を促進する。Th1サイトカイン、特にIFN- $\gamma$ およびIL-12は、Th2クローンの形成およびTh2サイトカインの产生を抑制し得る。

#### 【0116】

Sキラルオリゴヌクレオチドはまた、樹状細胞の生存、分化、活性化および成熟を改善するのに有用である。CpGは樹状細胞の細胞生存、分化、活性化および成熟を促進する独特の能力を有することが以前に示された。免疫磁性細胞選別によって血液から単離された樹状前駆細胞は、GM-CSFを伴って2日間イン

キュベーションする間に、樹状細胞の形態的および機能的特徴を発達させる。G M-C S F 無しでは、これらの細胞はアポトーシスを受ける。C p Gは、樹状細胞の生存および分化を促進することにおいて、GM-C S Fに優ることが以前に見出された (MHC II 発現、細胞の大きさ、粒度)。C p Gはまた、樹状細胞の成熟を誘導することが見出された。樹上細胞は、抗原を提示すること、および局所の環境でL P Sのような微生物分子を検出するパターン認識レセプターの発現によって、先天的免疫系と後天的免疫系との間にリンクを形成するので、C p Gで樹状細胞を活性化する能力は、癌およびアレルギー性疾患または感染性疾患のような障害に対するインビボまたはエキソビボでの免疫治療のために、C p Gに基づく戦略の使用を支持する。S キラルC p Gオリゴヌクレオチドはまた、樹状細胞の活性化および成熟誘導にも有用である。

#### 【0117】

C p G核酸はまた、ナチュラルキラー細胞溶解活性および抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を増加させる。ADCCは、S キラルC p Gオリゴヌクレオチドを、ガン細胞のような細胞標的に特異的な抗体と組み合わせて使用して実施され得る。S キラルC p Gオリゴヌクレオチドがこの抗体と組み合わせて被験体に投与された場合、被験体の免疫系は腫瘍細胞を破壊するように誘導される。ADC手順で有用な抗体は、体内で細胞と相互作用する抗体を含む。細胞標的に特異的なそのような多くの抗体が当該分野で記載され、そして多くが市販されている。これらの抗体としては、下記の表に示されたものが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0118】

【表A】

## 表A

抗体に基づく免疫療法製品の開発（会社による）

抗体の分類	適応	薬物名／抗体	会社
1	非ホジキンリンパ腫	Rituxan™(rituximab, Mabthera) (IDE-C2B8, キラマブ/ヒト抗CD20Mab)	IDCE/Genentech, Inc. Hoffmann-La Roche(米国において癌の処置のために認可された最初のモノクローナル抗体)
1	結腸直腸のための7ジュント治療(Dukes-C)	Panorex(登録商標) (17-1A)(マウスモノクローナル抗体)	Centocor/Glaxo/Ajinomoto
1	肺臓、肺、乳房、卵巣	Panorex(登録商標) (17-1A)(キラマウスマクローナル抗体)	Centocor/Ajinomoto
1	非小細胞肺、前立腺(7ジュント)	胰癌上のEGP40(17-1A)全癌(pancarcinoma)抗原に結合する3622W94 MAb	Glaxo Wellcome Plc
2	乳房/卵巣	Herceptin. 抗Her2 hMab	Genentech/Hoffmann-La Roche
2	腎細胞	C225(上皮増殖因子レセプター(EGFr)に対するキラマクローナル抗体)	ImClone Systems
2	乳房	C225(キラ抗EGFrマウスモノクローナル抗体)+タキソール	ImClone Systems
2	前立腺	C225(キラ抗EGFrマウスモノクローナル抗体)+ドキソルビシン	ImClone Systems(RPRから認可された)
2	前立腺	C225(キラ抗EGFrマウスモノクローナル抗体)+アドリマツシ	ImClone Systems
3	小細胞肺	BEC2(抗行性オタイプMab、GD、Iピートープを模倣する)(BCGを伴う?)	ImClone Systems
3	?	Ovarex(B43.13, 抗行性オタイプCA125, マウスMab)	Altarex, Canada
3	黒色腫	BEC2(抗行性オタイプMab、GD、Iピートープを模倣する)	ImClone Systems
3	黒色腫、小細胞肺	4B5抗行性オタイプAb	Novopharm Biotech, Inc.
4	肺、乳房、前立腺、結腸直腸	抗VEGF、RhuMAb(新脈管形成を阻害する)	Genentech
5	乳房、卵巣	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性(bispecific)抗体)	Medarex/Novartis
5	前立腺、非小細胞肺、肺臓、乳房	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性抗体)	Medarex/Novartis

表A7つづき

5	腎臓および結腸	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性抗体)	Medarex/Novartis
5	急性骨髓性(myleoid)白血病	MDX-22(ヒト化二特異性抗体、MAB結合体)(相補的かけ-7ケベーター)	Medarex
5	癌	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性抗体)	Medarex
5	肺、結腸、前立腺、卵巢、子宮内膜、膀胱および胃	MDX-220(TAG-72を発現する腫瘍に対して二特異的)	Medarex
5	前立腺	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性抗体)	Medarex/Novartis
5	EGFレセプター癌(頭および頸、前立腺、肺、膀胱、頸部、卵巢)	MDX-447(ヒト化抗EGFレセプター二特異性抗体)	Medarex/Merck KgaA
5	種々の癌(特に乳房)についてG-CSFを用いる組合せ治療	MDX-210(ヒト化抗HER-2二特異性抗体)	Medarex/Novartis
5	黒色腫、神経膠腫、神経芽細胞腫	MDX-260二特異的、GD-2を標的する	Medarex, Inc.
	骨転移	Quadramet(CYT-424)放射線治療薬剤	Cytogen Corp.
	非ホジキンリンパ腫	IDE-C-Y2B8(マウス、イットリウム90で標識された抗CD20 Mab)	IDE
	非ホジキンリンパ腫	Oncolym(131Iウ素に連結されたLym-1 m/クローナル抗体)	Technicclone international/Apha Therapeutics
	急性骨髓性(myleoid)白血病	SMART M195 Ab.ヒト化	Protein Design Labs
	非ホジキンリンパ腫	<sup>131</sup> I LYM-1(Oncolym™)	Technicclone Corporation/Cambridge Antibody Technology
	急性前骨髓球性白血病	ATRAGEN(登録商標)	Aronex Pharmaceuticals, Inc.
	頭および頸、非小細胞肺癌	C225(キメラ抗EGFr m/クローナル抗体)+シスプラチンまたは照射	ImClone Systems
	非ホジキンリンパ腫	Bexxar( <sup>131</sup> Iで標識された抗CD20 Mab)	Coulter Pharma(臨床結果は陽性であったが、この薬物は、有意な骨髄毒性に問題していた)
	カバージ肉腫	ATRAGEN(登録商標)	Aronex Pharmaceuticals, Inc.
	B細胞リンパ腫	化学療法と組み合わせるRituxan™(CD20に対するMAb)plus-B Ab	IDE Pharmaceuticals Corp./Genentech

表A7

慢性リンパ球性白血病 (CLL)	LDP-03, 白血球抗原CAMPATH に対するhuMAb	LeukoSite/Ilex Oncology
癌	ior t6(抗CD6、マウスMAb) CTCL	Center of Molecular Immunology
急性骨髓性白血病(A ML)	MDX-11(相補的活性化レセプタ -(CAR)モノクローナル抗体)	Medarex
急性骨髓性白血病(A ML)において浄化す るエビット骨髓	MDX-11(相補的活性化レセプタ -(CAR)モノクローナル抗体)	Medarex
卵巣	OV103(イットリウム-90標識化抗 体)	Cytogen
前立腺	OV103(イットリウム-90標識化抗 体)	Cytogen
非ホジキンリンパ腫	ATRAGEN(登録商標)	Aronex Pharmaceuticals, Inc.
白血病、リンパ腫	Zenapax(SMART 抗Tac(IL-2 レセプター)Ab、ヒト化)	Protein Design Labs
急性前骨髓球性白血 病	SMART M195 Ab、ヒト化	Protein Design Labs
黒色腫	MELIMMUNE-2(マウスモノクローナル抗 体治療ワクチン)	IDEC
黒色腫	MELIMMUNE-1(マウスモノクローナル抗 体治療ワクチン)	IDEC
結腸直腸および他	CEACIDE™(I-131)	Immunomedics, Inc.
非ホジキンB細胞リンパ腫	Pretarget™放射性抗体	NeoRx
癌	NovoMAb-G2(全癌(pancarcinoma)特異的Ab)	Novopharm Biotech, Inc.
脳	TNT(ヒストン抗原に対するキラM Ab)	Technicclone Corporation/Cam bridge Antibody Technology
脳	TNT(ヒストン抗原に対するキラM Ab)	Technicclone Corporation/Cam bridge Antibody Technology
脳、黒色腫、神経芽細 胞腫	Gliomab-H(モノクローナルヒト化Ab)	Novopharm
結腸直腸	GNI-250MAb	Genetics Institute/AHP
癌	EMD-72000(キメラEGFアンタゴニス ト)	Merck KgaA
非ホジキンB細胞リンパ腫	LymphoCide(ヒト化IL2抗体)	Immunomedics
急性骨髓性白血病	CHMA676(モノクローナル抗体結合 体)	Immunex/AHP

表A7-1

	結腸、肺、脾臓	Monopharm-C	Novopharm Biotech, Inc.
	放射線免疫療法	iοr egf/r3(抗EGF-Rヒト化Ab)	Center of Molecular Immunology
	結腸直腸	放射線免疫療法のためのiοr c5(マウスMab結腸直腸)	Center of Molecular Immunology
	乳癌	BABS(生合成抗体結合部位) タンパク質	Creative BioMolecules/Chiron
	腫瘍関連新脈管形成	FLK-2(胎児肝臓チーベー-2(FLK-2)に対するモノクローナル抗体)	ImClone Systems/Chugai
	小細胞肺	ヒト化Mab/小薬物(small drug)結合体	ImmunoGen, Inc.
	癌	ANA Ab	Procyon Biopharma, Inc.
	B細胞リバーゼ	SMART 1D10Ab	Protein Design Labs
	乳房、肺、結腸	SMART ABL 364Ab	Protein Design Labs/Novartis
	結腸直腸	ImmRAIT-CEA	immunomedics, Inc.

本発明はまた、抗原に非特異的な先天免疫活性化および感染性チャレンジに対する広汎なスペクトル耐性を誘導するための方法を含む。用語「抗原に非特異的な先天免疫活性化」は、本明細書中で使用される場合、B細胞以外の免疫細胞の活性化をいい、そして例えば、NK細胞、T細胞、または抗原から独立した様式にて応答し得る他の免疫細胞、あるいはこれらの細胞のいくつかの組み合わせの活性化を含み得る。感染性チャレンジに対する広汎なスペクトル耐性が、誘導される。なぜなら、これらの免疫細胞は、活性形態であり、そして任意の侵入している化合物または微生物に対して応答するようにプライムされる。これらの細胞は、特定の抗原に対して必ずしも特異的にプライムされるわけではない。これは、生物戦争、および旅行者のような上記の他の状況において特に有用である。

#### 【0119】

本発明はまた、CpG含有核酸のR立体異性体が免疫応答を低下させるという知見の基づく。このR立体異性体から部分的にまたは完全に構成されるCpG核酸は、免疫応答を予防することが所望される場合に、そのようにするために使用され得る。本明細書中で使用する場合、用語「予防する」とは、免疫応答の発生を阻害すること、ならびに免疫応答の発生の速度を低下させることをいう。

#### 【0120】

このR立体異性体はまた、免疫刺激性化合物（例えば、免疫刺激性CpG化合

物)の投与によって引き起こされる免疫応答を予防するために有用である。例えば、免疫刺激性C p G核酸が、過量の用量で投与されており、そして所望されるよりも強い免疫応答を引き起こす場合、R立体異性体が、C p Gの免疫刺激効果をアンタゴナイズするために投与され得る。あるいは、一過性の免疫刺激性効果のみが所望される場合、R立体異性体は、免疫刺激を低下させるために投与され得る。従って、適切な時間にR立体異性体を投与することによって、C p G誘導性免疫応答のタイミングを調節することが可能である。従って、R立体異性体は、過剰の免疫応答を患う被検体を処置するために、治療剤として使用され得る。「過剰な免疫応答」は、本明細書中で使用される場合、所望される免疫応答よりも大きなその応答をいう。例えば、過剰な免疫応答は、有害な副作用と関連し得る。過剰な免疫応答は、免疫刺激化合物（例えば、免疫刺激性C p Gオリゴヌクレオチド）を受けた被検体において誘導され得る。

#### 【0121】

C p GのR立体異性体はまた、免疫応答により媒介される障害の治療用処置のために有用である。従って、R立体異性体は、炎症性疾患を患うかまたはそれを患う危険性がある被検体を処置するための治療剤として使用され得る。「炎症性疾患または状態」は、本明細書中で使用する場合、傷害および感染の部位の局所的な炎症によって特徴付けられる任意の状態をいい、そして自己免疫疾患、感染性炎症状態の特定の形態（例えば、炎症性腸疾患、乾癬、歯肉炎、全身性エリテマトーデス、敗血症、髄膜炎、脳水腫、関節炎、腎炎、成人呼吸窮迫症候群、胰臓炎、筋炎、神経炎、結合組織疾患、静脈炎、動脈炎、脈管炎、アレルギー、アナフィラキシー、エールリヒア症、痛風、器官の移植および／または潰瘍性大腸炎、ならびに所望されない免疫細胞の活性化によって特徴付けられる、実質的に任意の他の状態を含むがこれらに限定されない。

#### 【0122】

特定の免疫刺激性SキラルC p Gオリゴヌクレオチドの刺激指数が、種々の免疫細胞アッセイにおいて試験され得る。好ましくは、B細胞増殖に関するこのC p Gオリゴヌクレオチドの刺激指数は、マウスB細胞培養物における<sup>3</sup>Hウリジンの取り込みによって決定されるように、少なくとも約5、好ましくは少なくと

も約10、より好ましくは少なくとも約15、および最も好ましくは少なくとも約20である。ここでマウスB細胞培養物は、37°Cで20時間にわたって20 μMのオリゴヌクレオチドと接触されており、そして1 μCiの<sup>3</sup>Hウリジンを用いてパルスされており；そして米国特許出願第08/386,063号および同第08/960,774号（それぞれ、1995年2月7日および1997年10月30日に出願）に対して優先権を主張する、PCT公開特許出願のPCT/US95/01570およびPCT/US97/19791において詳細に記載されるように、4時間後に回収され、そして計数される。インビボでの使用のために、例えば、SキラルCpGオリゴヌクレオチドが、免疫応答（例えば、抗体産生）を効果的に誘導し得ることが、重要である。RキラルCpGオリゴヌクレオチドの阻害指数は、刺激ではなく阻害が測定されることを除いて、同型のアッセイにおいて評価され得る。

#### 【0123】

適切な非メチル化CpGを含む核酸は、任意の脊椎動物において効果的であり得る。非メチル化CpGを含む異なる核酸は、哺乳動物種に依存して、最適な免疫刺激を引き起こし得る。従って、ヒトにおいて最適な刺激または阻害を引き起こすオリゴヌクレオチドは、マウスにおいて最適な刺激または阻害を引き起こし得ず、そしてマウスにおいて最適な刺激または阻害を引き起こすオリゴヌクレオチドは、ヒトにおいて最適な刺激または阻害を引き起こし得ない。当業者は、本明細書中に供給される指針を使用して、本明細書中に記載される慣用的なアッセイおよび／または当該分野において公知の慣用的なアッセイを使用して、目的の特定の哺乳動物種に有用な最適なオリゴヌクレオチドを同定し得る。

#### 【0124】

キラルCpGオリゴヌクレオチドは、被検体に直接投与され得るか、または核酸送達複合体と組み合せて投与され得る。「核酸送達複合体」は、標的化手段（例えば、標的細胞（例えば、B細胞表面）に対するより高親和性の結合および／または標的細胞による細胞性取り込みの増大を生じる分子と会合した（例えば、イオン結合または共有結合した；あるいはその中にカプセル化された）核酸分子を意味する。核酸送達複合体の例は、以下と会合した核酸を含む：ステロール（

例えば、コレステロール)、脂質(例えば、カチオン性脂質、ヴィロソームまたはリポソーム)、あるいは標的細胞特異的結合剤(例えば、標的細胞特異的レセプターにより認識されるリガンド)。好ましい複合体は、標的細胞によるインターナリゼーションの前の有意な脱共役を予防するに十分インビボで安定であり得る。しかし、この複合体は、適切な条件下で細胞内にて切断可能であり、その結果核酸は、機能的形態にて放出され得る。

### 【0125】

表面に抗原を送達するための送達ビヒクルが、記載されている。CpGオリゴヌクレオチドおよび/または抗原ならびに/あるいは他の治療剤は、(例えば、生理食塩水または緩衝液中で)単独でまたは当該分野で公知の任意の送達ビヒクルを使用して投与され得る。例えば、以下の送達ビヒクルが記載されている:渦巻き状物(Cochleate)(Gould-Fogeriteら、1994、1996);エマルソーム(emulsome)(Vancottら、1998、Lowellら、1997);ISCOM(Mowatら、1993、Carlssonら、1991、Huら、1998、Moreinら、1999);リポソーム(Childersら、1999、Michalekら、1989、1992、de Haan 1995a、1995b);生細菌ベクター(例えば、Salmonella、Escherichia coli、Bacillus calmette-guerin、Shigella、Lactobacillus)(Honeら、1996、Pouwelsら、1998、Chatfieldら、1993、Stoverら、1991、Nugentら、1998);生ウイルスベクター(例えば、ワクシニア、アデノウイルス、単純ヘルペス)(Galliechanら、1993、1995、Mossら、1996、Nugentら、1998、Flexnerら、1988、Morrowら、1999);ミクロスフェア(Guptaら、1998、Jonesら、1996、Maloyら、1994、Mooreら、1995、O'Haganら、1994、Eldridgeら、1989);核酸ワクチン(Fynanら、1993、Kuklinら、1997、Sasakiら、1998、Okadaら、1997、Ishiiら、1997);ポリマー(例えば、カルボキシメチルセルロ

ース、キトサン) (Hama jimaら、1998、Jabbal-Gilliら、1998) ; ポリマー環 (Wyattら、1998) ; プロテオソーム (Vancottら、1998、Lowellら、1988、1996、1997) ; フッ化ナトリウム (Hashiら、1998) ; トランスジェニック植物 (Tackettら、1998、Masonら、1998、Haqら、1995) ; ヴィロソーム (Gluckら、1992、Mengiardら、1995、Cryzら、1998) ; ウイルス様粒子 (Jiangら、1999、Leiblら、1998)。他の送達ビヒクルが、当該分野において公知であり、そしていくつかのさらなる例が、ベクターの考察において以下に提供される。

#### 【0126】

用語、CpGオリゴヌクレオチドの「有効量」は、所望の生物学的效果を実現するために必要なまたは十分な量をいう。例えば、粘膜免疫を誘導するためのスキラルCpGオリゴヌクレオチドの有効量は、抗原への曝露の際に抗原に応答してIgAの発生を引き起こすに必要な有効量であり、一方、全身免疫を誘導するために必要とされる有効量は、抗原への曝露の際に抗原に応答してIgGの発生を引き起こすに必要な有効量である。本明細書中に提供された教示を組み合せて、種々の活性化合物および重率因子 (weighting factor) (例えば、効力、相対的なバイオアベイラビリティー、患者の体重、有害な副作用の重篤度および投与の好ましい様式) の中から選択することによって、効果的な予防処置レジメまたは治療処置レジメが、計画され得、このレジメは、実質的な毒性を引き起こさず、そしてなお、特定の被検体を処置するために完全に効果的である。任意の特定の適用に対する有効量は、処置される疾患または状態、投与される特定のCpGオリゴヌクレオチド (例えば、核酸中の非メチル化CpGモチフ数またはそれらの位置、オリゴヌクレオチドのキラリティーの程度) 、抗原、被検体のサイズ、あるいは疾患または状態の重篤度のような因子に依存して変動し得る。当業者は、過度の実験を必要とせずに、特定のCpGオリゴヌクレオチドおよび/または抗原ならびに/あるいは他の治療剤の有効量を経験的に決定し得る。

#### 【0127】

本明細書中に記載される化合物の適切な用量は、代表的には約80mg/日～16,000mg/日、より代表的には約800mg/日～8000mg/日、および最も代表的には約800mg/日～4000mg/日の範囲である。被検体の体重に関して述べると、代表的な投薬量は、約1～200mg/kg/日、より代表的には約10～100mg/kg/日、および最も代表的には約10～50mg/kg/日の範囲である。被検体の体表面積に関して述べると、代表的な投薬量は、約40～8000mg/m<sup>2</sup>/日、より代表的には約400～4000mg/m<sup>2</sup>/日、および最も代表的には約400～2000mg/m<sup>2</sup>/日の範囲である。

#### 【0128】

いくつかの実施態様において、特に、CpGがプラスミドベクター中である場合、少なくとも50mgのCpGが、被検体に投与される。他の実施態様において、少なくとも75mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mgおよびこれらの間のあらゆる整数値のCpGが、被検体に投与される。

#### 【0129】

本明細書中に記載される任意の化合物について、治療的有効量は、初めに、細胞培養アッセイから決定され得る。例えば、B細胞活性化を誘導するために有用な、有効量のSキラルCpGオリゴヌクレオチドは、刺激指数に関して上記のインビトロアッセイを使用して評価され得る。この刺激指数は、特定の被検体に対する特定のオリゴヌクレオチドの有効量を決定するために使用され得、そしてこの投薬量は、被検体において所望のレベルを達成するために上方または下方に調整され得る。治療的有効量はまた、動物モデルから決定され得る。治療的有効用量はまた、ヒトにおいて試験されている（ヒトの臨床試験が開始されている）CpGオリゴヌクレオチドについて、ならびにワクチン接種の目的のための他のアジュバント（例えば、LT）および他の抗原のような同様の薬理学的活性を示すことが公知である化合物についてのヒトのデータから決定され得る。適用された用量は、投与された化合物の相対的なバイオアベイラビリティーおよび効力に基づいて調整され得る。上記の方法および当該分野において周知の他の方法に基づ

いて最大効力を達成するために用量を調整することは、当業者の能力の十分な範囲内である。

#### 【0130】

本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液中にて投与され、これは、塩、緩衝剤、保存剤、適合性キャリア、アジュバント、および必要に応じて、他の治療成分の、薬学的に受容可能な濃度を慣用的に含み得る。

#### 【0131】

治療における使用のために、有効量のCpGオリゴヌクレオチドは、所望の表面（例えば、粘膜、全身）にオリゴヌクレオチドを送達する任意の様式によって、被検体に投与され得る。本発明の薬学的組成物を「投与すること」は、当業者に公知の任意の手段によって達成され得る。投与の好ましい経路は、経口、非経口、筋肉内、鼻腔内、気管内、吸入、眼内、膣内、および直腸を含むがこれらに限定されない。

#### 【0132】

経口投与について、化合物（すなわち、CpGオリゴヌクレオチド、抗原、他の治療剤）は、活性化合物を当該分野において周知の薬学的に受容可能なキャリアと組み合せることによって、容易に処方され得る。このようなキャリアは、本発明の化合物が、処置される被検体による経口摂取のために、錠剤、丸剤、糖剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されることを可能にする。経口での使用のための薬学的調製物は、必要に応じて、所望される場合、錠剤または糖剤コアを得るために、適切な補助剤を加えた後に、得られた混合物を粉碎し、そして顆粒の混合物を処理して、固体賦形剤として得られ得る。適切な賦形剤は、特に、糖（ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む）のような充填剤；例えば、トウモロコシスター、コムギスター、イネスター、ジャガイモスター、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）のようなセルロース調製物である。所望される場合、崩壊剤（例えば、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン

酸ナトリウム) ) が、添加され得る。必要に応じて、経口処方物はまた、生理食塩水または内部の酸条件を中和するための緩衝液中にて処方され得るか、あるいはいかなるキャリアもなしに投与され得る。

#### 【0133】

糖剤コアは、適切なコーティングとともに提供される。この目的のために、濃縮した糖溶液が、使用され、これは、必要に応じてアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル (c a r b o p o l) 、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒の混合物を含み得る。染料または色素は、識別のために、または活性化合物の用量の異なる組合せを特徴付けるために、錠剤または糖剤コーティングに添加され得る。

#### 【0134】

経口にて使用され得る薬学的調製物は、ゼラチンから作製される押し出し成形 (p u s h - f i t) カプセル剤、ならびにゼラチンから作製される密封された軟カプセル剤および柔軟材 (例えば、グリセロールまたはソルビトール) を含む。押し出し成形カプセル剤は、充填剤 (例えば、ラクトース) 、結合剤 (例えば、スターチ) 、および／または滑択剤 (例えば、タルクもしくはステアリン酸マグネシウム) 、ならびに必要に応じて安定化剤と混合して、活性成分を含み得る。軟カプセル剤において、活性化合物は、適切な液体 (例えば、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコール) 中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定化剤が添加され得る。経口投与のために処方されたミクロスフェアもまた、使用され得る。このようなミクロスフェアは、当該分野において十分に定義されている。経口投与のための全ての処方物は、このような投与に適切な投薬量内であるべきである。

#### 【0135】

頬内投与について、この組成物は、従来の様式にて処方された錠剤またはロゼンジの形態を採用し得る。

#### 【0136】

吸入による投与については、本発明に従う使用のための組成物は、適切な噴霧

剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体）を使用する、加圧したパックまたは噴霧器からのエアロゾルスプレーの提示の形態にて都合よく送達され得る。加圧したエアロゾルの場合において、この投薬単位は、計測量を送達する弁を提供することによって決定され得る。吸入器または注入器における使用のための、例えば、ゼラチンのカプセル剤またはカートリッジが、処方され、これは、化合物の粉末混合物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはスターチ）を含む。

#### 【0137】

化合物を全身に送達することが所望される場合、この化合物は、注射による（例えば、ボーラス注射または持続性注入による）非経口投与のために処方され得る。注射のための処方物は、添加された保存剤と共に、単位投薬形態にて（例えば、アンプルにて、または多用量の容器にて）提示され得る。この組成物は、油状ビヒクルまたは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳剤のような形態を採用し得、そして懸濁剤、安定化剤および／または分散剤のような処方剤を含み得る。

#### 【0138】

非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油状注射懸濁液として調製され得る。適切な脂溶性溶媒またはビヒクルは、脂肪油（例えば、ゴマ油）または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド）、あるいはリポソームを含む。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を増大させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン）を含み得る。必要に応じて、この懸濁液はまた、この化合物の溶解度を増大させて、非常に濃縮された溶液の調製を可能にする、適切な安定化剤または薬剤を含み得る。

#### 【0139】

あるいは、活性化合物は、使用前には、適切なビヒクル（例えば、無菌の発熱性物質を含まない水）との構成のために粉末形態である。

## 【0140】

この化合物はまた、例えば、従来の坐剤基剤（例えば、ココアバターまたは他のグリセリド）を含む、坐剤または貯留（retention）浣腸のような直腸組成物または膣内組成物にて処方され得る。

## 【0141】

上記の処方物に加えて、この化合物はまた、蓄積調製物として処方され得る。このような長期作用処方物は、適切なポリマー材料もしく疎水性材料（例えば、受容可能な油状物中の乳剤として）またはイオン交換樹脂を用いてか、あるいは乏しい溶解性の誘導体として（例えば、乏しい溶解性の塩として）を用いて処方され得る。

## 【0142】

薬学的組成物はまた、適切な固体またはゲル相キャリアあるいは賦形剤を含み得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、スターチ、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリマー（例えば、ポリエチレン glycol）が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0143】

適切な液体または固体の薬学的調製物形態は、例えば、吸入のための水溶液もしくは生理食塩水溶液、マイクロカプセル化されたもの、渦巻き状化（en coated）されたもの、微小な金粒子上にコーティングされたもの、リポソーム中に含まれたもの、噴霧されたもの、エアロゾル、皮膚への移植のためのペレット、または皮膚を引っ搔く鋭い物体上に乾燥されたものである。薬学的組成物はまた、顆粒剤、散剤、錠剤、コーティングした錠剤、（微小）カプセル剤、坐剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、クリーム剤、ドロップ剤、または活性化合物の遅延された放出を有する調製物を含む。ここでこの調製物の賦形剤および添加剤および／または補助剤（例えば、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、腫脹（swelling）剤、滑択剤、香味剤、甘味剤または溶解剤）は、通例、上記のように使用される。薬学的組成物は、種々の薬物送達系における使用に適切である。薬物送達についての方法の簡潔な総論は、Langer, Science 249: 1527~1533, 1990（これは、本明細書中で参考として

援用される)を参照のこと。

#### 【0144】

CpGオリゴヌクレオチドおよび抗原は、それ自体(純粋)で、または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。医薬品において使用される場合、この塩は、薬学的に受容可能であるべきだが、薬学的に受容可能ではない塩が、その薬学的に受容可能な塩を調製するために、都合よく使用され得る。このような塩には、以下の酸から調製される塩を含むがこれらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、スルホン酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、このような塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩(例えば、カルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩)として調製され得る。

#### 【0145】

適切な緩衝剤は、以下を含む：酢酸および塩(1~2% w/v)；クエン酸および塩(1~3% w/v)；ホウ酸および塩(0.5~2.5% w/v)；ならびにリン酸および塩(0.8~2% w/v)。適切な保存剤は、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03 w/v)；クロロブタノール(0.3~0.9% w/v)；パラベン(0.01~0.25% w/v)およびチメロサール(0.004~0.02% w/v)を含む。

#### 【0146】

本発明の薬学的組成物は、有効量のCpGオリゴヌクレオチドおよび必要に応じて、抗原および/または他の治療剤(必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリアに含まれる)を含む。用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適切な、1以上の、適合性の固体または液体の、充填材、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。用語「キャリア」は、天然または合成の有機性成分または無機性成分を示し、この場合、活性成分は、本出願を容易にするように組み合せられる。薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的効力を実質的に損なう相互作用が存在しない様式において、本発明の化合物と共に、および互いに混合され得る。

**【0147】**

本発明において有用なCpGオリゴヌクレオチドまたは抗原は、さらなるアジュバント、他の治療剤、または抗原と混合されて送達され得る。混合物は、CpGオリゴヌクレオチドまたはいくつかの抗原あるいは他の治療剤に加えていくつかのアジュバントからなり得る。

**【0148】**

種々の投与経路が利用可能である。選択された特定の様式は、当然、選択された特定のアジュバントまたは抗原、処置される特定の状態および治療の効力に必要とされる投薬量に依存する。本発明の方法は、一般的には、医学的に受容可能である任意の投与様式を使用して実施され得、このような様式とは、臨床的に受容可能でない有害な効果を引き起こすことなく、免疫応答の効果的なレベルを生じる任意の様式がを意味する。投与の好みの様式は、上記で議論される。

**【0149】**

組成物は、単位投薬形態にて都合よく存在し得、そして薬学の分野にて周知の任意の方法によって調製され得る。全ての方法は、化合物を1以上の付属成分を構成するキャリアと会合させる工程を包含する。一般に、化合物は、この化合物を液体キャリア、微細に分割された固体キャリア、またはそれらの両方と均一かつ緊密に会合させること、次いで必要な場合、この生成物を成形することによって調製される。液体投薬単位は、バイアルまたはアンプルである。固体投薬形態は、錠剤、カプセル剤および坐剤である。患者の処置については、化合物の活性、投与の様式、免疫の目的（すなわち、予防または治療）、障害の性質および重篤度、患者の年齢および体重に依存して、異なる用量が必要とされ得る。所定の用量の投与が、個々の用量の形態での単回投与、そうでなければいくつかのより少ない用量単位の両方によって、実行され得る。数週間または数ヶ月離れた特定の間隔での用量の複数投与は、抗原特異的応答をブーストするために有用である。

**【0150】**

他の送達系は、時限放出、遅延放出、または徐放性放出の送達系を含み得る。このような系は、化合物の反復投与を回避し得、このことは、被検体および医師

にとつての簡便性を増大させる。多くの型の放出送達系が、当業者に利用可能であり、そして公知である。これらには、ポリマーベースの系（例えば、ポリ（ラクチドーグリコチド）、コポリオキザラート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ無水物）が挙げられる。薬物を含む前述のポリマーの微小カプセル剤は、例えば、米国特許第5,075,109号に記載される。送達系はまた、以下の非ポリマー送達系を含む：ステロール（例えば、コレステロール、コレステロールエステル）および脂肪酸または中性脂肪（例えば、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリド）を含む脂質；ヒドログル放出系；サイラスティック系；ペプチドベースの系；ろうコーティング；従来の結合剤および賦形剤を使用して圧縮した錠剤；部分的に融合した移植片など。特定の例は、以下のものを含むがこれらに限定されない：（a）本発明の薬剤が、米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号、および同第5,736,152号に記載されるようなマトリクス内の形態に含まれている侵食系、ならびに（b）活性成分が、米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号および同第5,407,686号に記載されるようなポリマーから制御された速度で浸透する拡散系。さらに、ポンプベースのハードウェア送達系が使用され得、これらのうちのいくつかは、移植に採用される。

### 【0151】

本発明はさらに、以下の実施例によって例示され、これは、さらなる限定としてはどのようにも解釈されるべきではない。本出願の至る箇所で引用される全ての参考文献（参考文献、発行された特許、公開特許出願、および共有に係る特許出願を含む）の内容の全体は、参考として本明細書によって明示的に援用される。

### 【0152】

（実施例）

（方法）

（増殖アッセイ）簡潔には、BALB/cマウス（4～18週齢）に由來の脾細胞を、96ウェルマイクロタイプレートにおいて、RPMI中 $5 \times 10^5$

$\sim 10^6$  細胞/ $m^l$  で 44 時間培養し、次いで、 $1 \mu Ci$  の  $^{3}H$  チミジンで 4 時間パルスし、その後収集した。cpm をシンチレーション計数によって決定した。次いで、増殖アッセイを実行して、本質的に以前に記載された (Krieg, A. K. ら、1995、Nature、374: 546) ように B 細胞活性化を測定した。

#### 【0153】

(オリゴヌクレオチド) 非立体規則性オリゴデオキシヌクレオチドを、標準的なホスホルアミダイト法によって調製した。立体的に純粋な (stereopure) ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドを、Stecら (Stec, W. J. ら、1995、J. Am. Chem. Soc.、117: 12019) のオキサチアホスホラン (oxathiaaphopholane) 方法によって調製した。配列 T C A A C G T T (配列番号 21) を、広汎なファミリーの CpG DNA を示す広汎な免疫刺激効果を有する代表的な CpG モチーフとしての研究のために選択した。

#### 【0154】

(結果) BALB/c 脾細胞を、全てのヌクレオチド間結合が表 2 に示される濃度で R または S のいずれかである立体的に純粋なオリゴヌクレオチドを用いて培養した。S 立体異性体 (CG-S) のみが、ちょうど  $1 \mu g/m^l$  の濃度で容易に検出可能であった B 細胞増殖を誘導した。対照的に、R 立体異性体 (CG-R) は、 $24 \mu g/m^l$  の濃度でさえもいかなる増殖をも誘導しなかった。

#### 【0155】

#### 【表 2】

表2

オリゴヌクレオチド	濃度	cpm
CG-R	1 µg/ml	776 ± 38
	6 µg/ml	603 ± 16
	12 µg/ml	417 ± 30
	24 µg/ml	405 ± 74
CG-S	1 µg/ml	2744 ± 938
	6 µg/ml	6070 ± 2159
	12 µg/ml	11,529 ± 2461
	24 µg/ml	34,394 ± 9998
なし		1258 ± 273

表1に示される配列と同じ配列を有する立体的に不規則なオクタマーは、キラル的に純粋なS異性体と比較して、増殖性効果を減少した。さらに、S立体異性体で刺激されている細胞にR立体異性体を添加することは、増殖性効果における用量依存性の減少を引き起こした。従って、R立体異性体は、S異性体の免疫刺激をアンタゴナイズする。出願人らは、いかなる機構にも束縛されることを望まないが、これらの結果についての1つの可能性のある説明は、CpG効果を媒介する結合タンパク質が立体依存的な様式にてCpG-DNAに結合することであると考えられる。あるいは、CpGがその作用部位に到達する輸送機構が、立体選択的であり得る。この機構とは関係なく、出願人らは、CpGのS立体異性体が免疫応答の調節に関与することを実証した。

### 【0156】

先に記載された明細書は、当業者が本発明を実施し得るに十分であると考慮される。本発明は、提供された実施例により範囲を限定されない。なぜなら、本実施例は、本発明の1つの局面の1つの例示として意図され、そして他の機能的に等価な実施態様が、本発明の範囲内だからである。本明細書中に示され、かつ記載された改変に加えて、本発明の種々の改変が、先の記載から当業者に明らかになり、そして添付の特許請求の範囲の範囲内である。本発明の利点および対象は、本発明の各実施態様によって必ずしも包含されるとは限らない。

## 【0157】

本出願に列挙される全ての参考文献、特許および特許公開は、それらの全体が本明細書中で参考として援用される。

## 【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> University of Iowa Research Foundation
      CpG ImmunoPharmaceuticals, Inc.

<120> Stereoisomers of CpG Oligonucleotides
      and Related Methods

<130> C1039/7028WO/HCL

<150> US 60/094,370
<151> 1998-07-27

<160> 94

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 1
gctagacgtt agcgt          15

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 2
gctagatgtt agcgt          15

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (7)...(7)
<223> m5c

<223> Synthetic

<400> 3
gctagacgtt agcgt          15

<210> 4

```

<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (13)...(13)		
<223> m5c		
<223> Synthetic		
<400> 4		
gctagacgtt agcgt		15
<210> 5		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 5		
gcatgacgtt gagct		15
<210> 6		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 6		
atggaaaggtc cagcggttctc		20
<210> 7		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 7		
atcgactctc gagcggttctc		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<221> modified_base		
<222> (3)...(3)		
<223> m5c		

```

<223> Synthetic

<400> 8
atcgactctc gagcggttctc                                20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (18)...(18)
<223> m5c

<223> Synthetic

<400> 9
atcgactctc gagcggttctc                                20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 10
atggaaggtc caacgttctc                                20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 11
gagaacgctg gaccttccat                                20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
gagaacgctc gaccttccat                                20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 13	
gagaacgctc gaccttcgat	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> modified base	
<222> (14)...(14)	
<223> m5c	
<223> Synthetic	
<400> 14	
gagaacgctg gaccttccat	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 15	
gagaacgatg gaccttccat	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 16	
gagaacgctc cagcaactgat	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 17	
tccatgtcg tccgtatgct	20

```

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (12) ... (12)
<223> m5c

<223> Synthetic

<400> 18
tccatgtcg tccgtatgct          20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 19
tccatgacgt tcctgatgct          20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 20
tccatgtcg tcctgctgat          20

<210> 21
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 21
tcaacgtt                         8

<210> 22
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

```

<pre> &lt;400&gt; 22 tcagcgct  &lt;210&gt; 23 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 23 tcatcgat  &lt;210&gt; 24 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 24 tcttcgaa  &lt;210&gt; 25 &lt;211&gt; 7 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 25 caacgtt  &lt;210&gt; 26 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 26 ccaacgtt  &lt;210&gt; 27 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence  &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	8  8  8  8  8  7  8
--	---

aacgttct	8
<210> 28	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 28	
tcaacgtc	8
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 29	
atggactctc cagcggttctc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 30	
atggaaggtc caacgttctc	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 31	
atcgactctc gagcggttctc	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 32	
atggaggctc catcggttctc	20

<210> 33  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (14)...(14)  
<223> m5c

<223> Synthetic

<400> 33  
atcgactctc gagcggttctc 20

<210> 34  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (18)...(18)  
<223> m5c

<223> Synthetic

<400> 34  
atcgactctc gagcggttctc 20

<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic

<400> 35  
tccatgtcgg tcctgatgct 20

<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic

<400> 36  
tccatggcgg tcctgatgct 20

<210> 37  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>	
<223> Synthetic	
<400> 37	
tccatgggg tcctgatgt	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 38	
tccatgacgg tcctgatgt	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 39	
tccatgtcga tcctgatgt	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 40	
tccatgtcg c tcctgatgt	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 41	
tccatgtcgt ccctgatgt	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<pre> &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 42 tccatgacgt gcctgatgct </pre>	20
<pre> &lt;210&gt; 43 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	
<pre> &lt;400&gt; 43 tccataaacgt tcctgatgct </pre>	20
<pre> &lt;210&gt; 44 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	
<pre> &lt;400&gt; 44 tccatgacgt ccctgatgct </pre>	20
<pre> &lt;210&gt; 45 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	
<pre> &lt;400&gt; 45 tccatcaacgt gcctgatgct </pre>	20
<pre> &lt;210&gt; 46 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	
<pre> &lt;400&gt; 46 ggggtaaacgt ttgacgggg </pre>	19
<pre> &lt;210&gt; 47 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	

<400> 47 ggggtcagtc gtgacgggg	19
<210> 48 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 48 gctagacgtt agtgt	15
<210> 49 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 49 tccatgtcgt tcctgatgt	20
<210> 50 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 50 accatggacg atctgtttcc cctc	24
<210> 51 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 51 tctcccaagcg tgcgccat	18
<210> 52 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 52	

accatggacg aactgtttcc cctc  
 <210> 53  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 53  
 accatggacg agctgtttcc cctc  
 <210> 54  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 54  
 accatggacg acctgtttcc cctc  
 <210> 55  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 55  
 accatggacg tactgtttcc cctc  
 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 56  
 accatggacg gtctgtttcc cctc  
 <210> 57  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 57  
 accatggacg ttctgtttcc cctc

24

24

24

24

24

<210> 58	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 58	
cacgttgagg ggcatt	15
<210> 59	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 59	
tcagcgtgcg cc	12
<210> 60	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 60	
atgacgttcc tgacgtt	17
<210> 61	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 61	
tctcccagcg ggcgcatt	17
<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 62	
tccatgtcgat tcctgtcgat	20
<210> 63	

<211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 63 tccatagcgt tccttagcggt	20
<210> 64 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 64 tcgtcgctgt ctccccttct t	21
<210> 65 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 65 tcctgacgtt cctgacgtt	19
<210> 66 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 66 tcctgtcggtt cctgtcggtt	19
<210> 67 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic	
<400> 67 tccatgtcggt ttgtcggt	20
<210> 68 <211> 20	

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 68
tcctgtcggtt ccttgtcggtt                                20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 69
tccttgtcggt tccttgtcggtt                                20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 70
tcctgtcggtt ttttgtcggtt                                20

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 71
tcgtcgctgt ctggcccttct t                                21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 72
tcgtcgctgt tgtcgtttct t                                21

<210> 73
<211> 20
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 73	
tccatgcgtg cgtgcgtttt	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 74	
tccatgcgtt gcgttgcgtt	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 75	
tccacacgt tttcgacgtt	20
<210> 76	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 76	
tcgtcggtt cgtttgtcgtt	20
<210> 77	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 77	
tcgtcgttt gtgcgtttgt cgtt	24
<210> 78	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>		
<223> Synthetic		
<400> 78		
tcgtcgttgt cgaaaaatcg tt	22	
<210> 79		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 79		
gcgtgcgttg tcgtttgtcg t	21	
<210> 80		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 80		
tgtcgtttgt cgaaaaatcg t	21	
<210> 81		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 81		
tgtcgttgtc gttgtcgaa tcgtt	25	
<210> 82		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 82		
tgtcgttgtc gttgtcgaa	19	
<210> 83		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

<pre> &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 83 tcgtcgctcg t cgtt </pre>	14
<pre> &lt;210&gt; 84 &lt;211&gt; 13 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 84 tgtcgttgc gtt </pre>	
<pre> &lt;210&gt; 85 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 85 tccatagcgt tcctagcgtt </pre>	
<pre> &lt;210&gt; 86 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 86 tccatgacgt tcctgacgtt </pre>	
<pre> &lt;210&gt; 87 &lt;211&gt; 6 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic  &lt;400&gt; 87 gtcgyt </pre>	
<pre> &lt;210&gt; 88 &lt;211&gt; 7 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence </pre>	
<pre> &lt;220&gt; &lt;223&gt; Synthetic </pre>	

(100)

特表2002-521489

<400> 88	7
tgtcggt	
<210> 89	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 89	
agctatgacg ttccaagg	18
<210> 90	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 90	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 91	
atcgactctc gaacgttctc	20
<210> 92	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 92	
tccatgtcgg tcctgacgca	20
<210> 93	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 93	

(101)

特表2002-521489

tcttcgat

8

<210> 94  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic

<400> 94

ataggaggtc caacgttctc

20

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 99/17100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07H21/00 A61K31/70 C12N15/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07H A61K C12N.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. e.g.
X	WO 96 39154 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC ; COOK PHILLIP DAN (US); HOKE GLENN (US)) 12 December 1996 (1996-12-12) claims 1-6	1,3,5, 29,31, 60,62, 64,74,76
X	WO 96 19572 A (HYBRIDON INC ; TANG JINYAN (US); ROSKEY ALLYSSEN M (US); AGRAWAL SUD) 27 June 1996 (1996-06-27) figure 1	60,64,74
A	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 (1996-02-01)	
A	WO 98 18810 A (UNIV IOWA RES FOUND ; KLINE JOEL N (US); KRIEG ARTHUR M (US)) 7 May 1998 (1998-05-07)	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
17 November 1999	23/11/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eport. Fax: (+31-70) 340-3010	Authorized officer  Bardilli, W	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 99/17100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639154 A	12-12-1996	US 5599797 A US 5576302 A US 5607923 A US 5635488 A US 5587361 A US 5661134 A US 5654284 A US 5620963 A AU 698739 B AU 6252896 A CA 2223103 A EP 0831854 A JP 10510433 T NO 975558 A	04-02-1997 19-11-1996 04-03-1997 03-06-1997 24-12-1996 26-08-1997 05-08-1997 15-04-1997 05-11-1998 24-12-1996 12-12-1996 01-04-1998 13-10-1998 26-01-1998
WO 9619572 A	27-06-1996	AU 4514696 A CA 2208528 A CN 1175281 A EP 0807171 A JP 10511267 T	10-07-1996 27-06-1996 04-03-1998 19-11-1997 04-11-1998
WO 9602555 A	01-02-1996	AU 1912795 A CA 2194761 A EP 0772619 A JP 10506265 T	16-02-1996 01-02-1996 14-05-1997 23-06-1998
WO 9818810 A	07-05-1998	AU 5242498 A EP 0948510 A	22-05-1998 13-10-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークド(参考)
A 61 P 31/00		A 61 P 31/00	
	1 7 1		1 7 1
35/00		35/00	
37/04		37/04	
37/06		37/06	
37/08		37/08	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE,  
LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,  
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04  
NA14 ZA33 ZA34 ZA59 ZA89  
ZB02 ZB05 ZB08 ZB09 ZB11  
ZB13 ZB21 ZB26 ZB32